

9 u

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA BETA₁A/BETA₁C GLOBULINE
EN RAPPORT
AVEC LE COMPLÈMENT SÉRIQUE
DANS L'ESPÈCE HUMAINE**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1970

par

Catherine CASTÉRA

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Clermont-Ferrand

Président : M. DASTUGUE, Professeur
Membres du Jury : M. BASTIDE, Professeur
M. PIGNIDE, Professeur
M. GENTOU, Maître de conférences agrégé

IMPRIMERIE CLEDER
28, rue de la Pomme
T O U L O U S E

1970

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA BETA₁A/BETA₁C GLOBULINE
EN RAPPORT
AVEC LE COMPLÈMENT SÉRIQUE
DANS L'ESPÈCE HUMAINE**

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA BETA₁A/BETA₁C GLOBULINE
EN RAPPORT
AVEC LE COMPLÈMENT SÉRIQUE
DANS L'ESPÈCE HUMAINE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1970

par

Catherine CASTÉRA

*Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux de Clermont-Ferrand*

Président : M. DASTUGUE, Professeur
Membres du Jury : M. BASTIDE, Professeur
M. PIGNIDE, Professeur
M. GENTOU, Maître de conférences agrégé

IMPRIMERIE CLEDER
28, rue de la Pomme
T O U L O U S E

1970

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen : M. G. MEYNIEL
 Assesseur : M. COULET
 Doyen Honoraire : M. CUVELIER
 Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires } M^{me} BLANQUET
 M. BUREAU
 M. POMME
 M. WILLEMIN-CLOG

I. — PROFESSEURS TITULAIRES

MM.
 Clinique Chirurgicale BARRIER
 Chimie Biologique et Pharmacodynamie BASTIDE
 Clinique Obstétricale BAUDON
 Chimie Analytique BERGER
 Pathologie Médicale BERGERON
 Botanique et Microbiologie COULET
 Hydrologie et Climatologie CUVELIER
 Biochimie Médicale DASTUGUE
 Chimie Pharmaceutique et Toxicologie DAUPHIN
 Anatomie Pathologique DELAGE
 Pharmacologie DUCHENE-MARULLAZ
 Pharmacie Galénique FEBVRE
 Physique Pharmaceutique GAILLARD (M^{me})
 Clinique Chirurgicale B GERMAIN
 Clinique Médicale A GRAS

Technique Chirurgicale JACQUEMET
 Séméiologie Médicale JALLUT
 Pathologie Chirurgicale LATAIX
 Anatomie MERCIER
 Biophysique Médicale MEYNIEL
 Clinique Pneumo-Phtisiologique MOLINA
 Médecine Légale et Médecine Sociale PETIT
 Clinique Neurologique et Psychiatrique POROT
 Matière Médicale POURRAT
 Thérapeutique RAMPON (M^{le})
 Clinique Ophtalmologique ROUHER
 Clinique Médicale B TERRASSE
 Physiologie THIEBLOT
 Clinique Oto-Rhino-Laryngologie THOMAS
 Pharmacie Chimique TRONCHE
 Histologie et Embryologie TURCHINI
 Bactériologie et Hygiène VAURS

II. — PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.
 Biophysique Médicale ALFIERI

Médecine Légale et Médecine du Travail CHAMPEIX
 Electro-Radiologie VIALLET

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

Chimie Minérale et Minéralogie CHATONIER (M^{le})
 Bactériologie CLUZEL

Pédiatrie et Puériculture MENUT
 Médecine Générale PIGNIDE
 Matière Médicale POURRAT (M^{me})

IV. — MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.
 Toxicologie ANDRAUD
 Thérapeutique, Réanimation Médicale BAGUET
 Physiologie BOUCHER
 Chirurgie Générale BOURDEIX
 Anesthésiologie CONSTANTIN
 Pharmacie Chimique COUQUELET
 Oto-Rhino-Laryngologie GAILLARD DE COLLOGNY
 Biochimie Médicale GENTOU

Histologie, Embryologie, Cyto-génétique MALET
 Médecine Interne MARCHEIX
 Médecine Générale et Thérapeutique MOINADE (M^{me})
 Stomatologie PERI
 Chimie Analytique PETIT (M^{me})
 Cancérologie Clinique PLAGNE
 Pédiatrie RAYNAUD
 Ophtalmologie SOLE
 Anatomie Pathologique VENRIES DE LAGUILLAUM

V. — AGREGES

MM.
 Orthopédie FOURRIER
 Chirurgie Générale HOUDARD

Neuro-Chirurgie JANNY
 Pneumo-Phtisiologie RENARD
 Neurologie et Psychiatrie TOURNILHAC

Attache Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 juin 1956).

A MES PARENTS

En témoignage de toute ma reconnaissance.

A MA SŒUR

Avec mon affection.

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DASTUGUE

*Professeur de Biochimie Médicale,
Docteur en Médecine et en Pharmacie,
Docteur ès-Sciences,
Lauréat de l'Académie de Médecine
et de l'Académie des Sciences,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Commandeur de la Santé Publique,
Commandeur des Palmes Académiques,
Biologiste des Hôpitaux*

Qui nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Laboratoire, qui a sans cesse guidé nos recherches tout en nous prodiguant ses conseils éclairés.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude et le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BASTIDE

*Professeur de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie,
Pharmacien Chef des Hôpitaux,
Chevalier des Palmes Académiques.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIGNIDE

*Professeur de Médecine Générale et Thérapeutique,
Médecin des Hôpitaux,
Chevalier des Palmes Académiques.*

MONSIEUR LE DOCTEUR CLAUDE GENTOU

*Maître de Conférences agrégé de Biochimie,
Biologiste des Hôpitaux,*

qui nous a inspiré le sujet de cette
thèse et qui nous a constamment gui-
dée au cours de ce travail.

Qui nous ont fait l'honneur de juger
cette thèse.

En témoignage de notre respectueuse
gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.

PREMIERE PARTIE

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA β_1A/β_1C GLOBULINE

CHAPITRE I. — HISTORIQUE ET GENERALITES SUR LA β_1A/β_1C GLOBULINE.

CHAPITRE II. — CARACTERES PHYSICOCHIMIQUES.

- 1) Poids moléculaire.
- 2) Composition chimique.
- 3) Constantes physiques.
- 4) Caractères chimiques.
- 5) Caractères immunologiques.

CHAPITRE III. — METHODES DE PREPARATION.

CHAPITRE IV. — METHODES DE DOSAGE.

CHAPITRE V. — LIEUX DE SYNTHÈSE.

CHAPITRE VI. — RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA β_1A/β_1C GLOBULINE.

- A. — Le complément.
- B. — Relation entre la β_1C globuline et le complément.

CHAPITRE VII. — VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA β_1A/β_1C GLOBULINE.

- A. — Variations physiologiques.
- B. — Variations pathologiques.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION

CHAPITRE I. — METHODES UTILISEES.

- A) Immuno-électrophorèse.
 - I. — Principe.
 - II. — Matériel.
 - III. — Méthode.
- B) Méthodes de dosage des protéines plasmatiques par immunodiffusion. Méthode de MANCINI.
 - I. — Principe.
 - II. — Matériel.
 - III. — Méthode.
- C) Dosage de la complémentémie.
 - a) *Dosage du complément total : C.*
 - I. — Principe.
 - II. — Matériel.
 - III. — Méthode.
 - b) *Dosage de la troisième fraction du complément : C₃.*
 - I. — Principe.
 - II. — Matériel.
 - III. — Méthode.
- C) Calculs statistiques utilisés.
- D) Echantillons objets de l'étude.

CHAPITRE II. — RESULTATS EXPERIMENTAUX.

- A) Etude des facteurs physicochimiques pouvant faire varier la β_1A/β_1C globuline.
 - I. — Etude analytique.
 - II. — Etude synthétique.
- B) Etude en fonction de l'âge.
 - I. — Etude analytique.
 - II. — Etude synthétique.
- C) Etude dans des cas de dysglobulinémies chez l'adulte.

CHAPITRE III. — DISCUSSION.

RESUME ET CONCLUSION.

BIBLIOGRAPHIE.

Abréviations utilisées

I.E.	=	Immuno-électrophorèse.
C	=	Complément total.
C ₃	=	Troisième composant du complément.
Ig	=	Immunoglobuline.
α_2	=	Alpha ₂ .
β_1	=	Béta ₁ .
γ	=	Gamma.
R.A.A.	=	Rhumatisme articulaire aigu.
G.N.A.	=	Glomérulonéphrite aiguë.
L.E.D.	=	Lupus érythémateux disséminé.
H	=	Heure.

INTRODUCTION

Un regain d'intérêt se manifeste vis-à-vis du complément comme en témoignent les travaux récents, nombreux, consacrés à ce système complexe, longtemps mal connu, au point que ROSEMBERG en 1964 le considérait encore comme un « *luxus naturae* ».

Les progrès considérables réalisés dans la connaissance de la chimie et des interactions fonctionnelles des composants du complément ont abouti à un concept moléculaire, selon lequel la base chimique de la fonction du complément consiste à des interactions protéine-protéine dont certaines aboutissent à la formation de complexes doués d'activités enzymatiques.

Tenant compte de la relation qui existe entre la β_1C globuline et la troisième fraction C_3 du complément, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude de l'action de quelques facteurs physico-chimique sur la β_1A/β_1C globuline et l'étude systématique de cette globuline et du facteur C_3 du complément parallèlement à la détermination des immunoglobulines IgG qui ont un pouvoir de fixation du complément et IgA qui ne le fixent pas.

L'examen de nombreux diagrammes d'immuno-électrophorèse effectués sur une population hospitalière hétérogène, nous a montré que des variations assez larges apparaissaient dans les proportions correspondantes des fractions β_1A sérologiquement inactive et β_1C sérologiquement active.

Dans une première partie d'ordre bibliographique, nous avons essayé de dresser un tableau de nos connaissances actuelles sur la β_1A/β_1C globuline. Après quelques généralités, nous décrirons ses caractères physico-chimiques, les méthodes utilisées pour sa préparation et son dosage, ses lieux de synthèse et nous nous efforcerons de mettre en évidence le rôle physiologique de la β_1A/β_1C globuline (en particulier le rapport de la fraction β_1C avec le troisième composant C_3 du complément) ainsi que les variations de son taux au cours d'un certain nombre de circonstances.

Dans une deuxième partie d'ordre expérimental, nous décrirons les méthodes utilisables pour la mise en évidence et le dosage de

cette globuline. Nous rappelons en quoi consiste l'immuno-électrophorèse et le dosage des protéines plasmatiques par immuno-diffusion radiale. Nous envisageons enfin le dosage de la complémentémie aussi bien en ce qui concerne le complément total C que sa troisième fraction C₃. Nous faisons mention des calculs statistiques utilisés en l'occurrence. Etant donné, que la généralisation de ces méthodes est relativement restreinte, nous nous sommes crue autorisée à donner à ces descriptions un certain développement.

Nos résultats expérimentaux constituent le chapitre II de cette partie et nous les avons présentés sous les trois rubriques suivantes de variance :

- facteurs physico-chimiques
- âge des individus
- facteurs pathologiques.

Nous terminons (chapitre III) par un essai de discussion et une conclusion générale.

Nous ne saurions terminer cette introduction sans remercier Monsieur le Professeur DASTUGUE de nous avoir fourni les moyens matériels nécessaires à l'exécution de ce travail et les précieux conseils qui nous ont aidée à le rédiger.

Notre plus vive gratitude va au Docteur Claude GENTOU, Maître de conférences agrégé de Biochimie, qui a inspiré ce travail et nous a permis, grâce à son aide éclairée et vigilante, de mener à bien sa réalisation.

Enfin, nous voulons dire notre reconnaissance à Messieurs les Professeurs BASTIDE et PIGNIDE qui ont bien voulu participer à la soutenance de ce mémoire.

PREMIERE PARTIE

**CONNAISSANCES ACTUELLES SUR
LA BETA₁A/BETA₁C GLOBULINE**

CHAPITRE I

HISTORIQUE — GÉNÉRALITÉS

Il existe dans le sérum une β_1 globuline de mobilité électrophorétique variable, très sensible au vieillissement et au chauffage du sérum, à l'action de certains agents chimiques, et présentant des rapports étroits avec le troisième composant du complément C_3 .

1. — En 1947, ONCLEY (152) avait décrit deux β_1 euglobulines, exemptes de lipide, dans le sérum humain et ayant respectivement des vitesses de sédimentation 7 et 20 S (Unité SVEDBERG). Ces auteurs ne faisaient pas mention d'une euglobuline de vitesse de sédimentation 9,5 S. Ils avaient décrit cependant plusieurs composants de 9 à 10 S :

- un premier appartenant aux α_2 globulines
- un deuxième à la fraction γ
- un troisième représentant le fibrinogène.

D'après ONCLEY, la fraction 10 S. serait une association des molécules 7 S.

Lors de l'analyse immuno-électrophorétique on distingue quatre protéines différentes de mobilité β_1 en ne tenant pas compte des β_1 lipoprotéines (65).

— Une protéine ayant pour rôle physiologique le transport du fer dans le sang appelée sidérophiline ou transferrine, étudiée bien avant les trois autres fractions (27).

— La β_1B globuline ou hémopexine (186) qui fixe l'hème libérée de l'hémoglobine.

— Les deux autres β_1 globulines présentent une relation avec le complément :

- l'une est active sérologiquement, c'est la β_1C globuline,
- l'autre est inactive, c'est la β_1A globuline.

Depuis 1960, on désigne ces protéines sous le nom de β_1A/β_1C globuline.

2. — La présence de cette globuline dans le sérum avait été signalée sous le nom de β_2B globuline par SCHEIDEGGER (184) et HEREMANS (84).

3. — En 1960 BISERTE (30) et coll. avaient mis en évidence par électrophorèse une protéine qu'ils appelaient β_1A globuline mais correspondant à l'hémopexine et non à la β_1A/β_1C globuline.

4. — MULLER-EBERHARD (138) a étudié ces deux arcs continus de précipitation de la β_1A/β_1C globuline.

— Si le sérum est frais, il note la présence d'un arc incurvé de mobilité électrophorétique un peu plus lente que celle de la sidérophiline.

— Dans les sérums conservés plusieurs jours, il remarque l'existence d'un arc incurvé, mais de mobilité électrophorétique beaucoup plus rapide que le précédent.

— Après conservation du sérum quelques jours à $+4^\circ C$, on trouve une ligne à deux courbures, une, correspondant à celle existant dans les sérums frais, l'autre à celle des sérums vieillis. Les deux arcs sont moins incurvés, et sont en continuité, preuve que ces différents aspects ont les mêmes déterminants antigéniques.

MULLER-EBERHARD leur a donné des noms différents :

β_1C globuline pour la fraction lente,

β_1A globuline pour la fraction rapide.

Ce même auteur a pu :

— Isoler chacune d'elles.

— Prouver leur nature euglobulinique.

— Evaluer leur teneur en glucides.

— Etudier chacune au point de vue : immunologique,
chimique,
vitesse de sédimentation.

— Etablir les relations du constituant lent avec le troisième composant C_3 du complément.

5. — PEETOOM (164) a abordé le problème d'une autre manière en cherchant à préparer un immunsérum anticomplément humain. Dans ce but, il met en contact un précipité spécifique ovalbumine-anticorps de lapin et du sérum humain. Ce précipité, ayant en principe absorbé le complément, est lavé pour le débarrasser des protéines seulement entraînées et, ensuite, est injecté à des lapins. Les anticorps, ainsi produits, sont dirigés contre une β_1 globuline et cette interaction engendre une ligne à double courbure qui se

réunit avec celle donnée par la seule β_1 globuline du sérum humain normal ; cette β_1 globuline sérique est donc la β_1A globuline. Il y a en outre à un taux beaucoup plus faible, des anticorps contre deux α -globulines.

PEETOOM a montré qu'il existe des relations entre la courbure lente de la ligne de précipitation β_1 et le complément.

6. — ZIMMER (227) a suivi les modifications de la ligne de précipitation β_1A globuline selon les conditions expérimentales :

— En déposant du sérum frais dans le réservoir de départ, sans le chauffer, l'immuno-électrophorèse étant faite en chambre froide, il observe la présence d'une protéine de mobilité électrophorétique relativement lente, donnant un arc de précipitation net, assez peu étendu et situé entre les β_1 et les β_2 globulines.

— Si le sérum a été conservé un certain nombre de jours à la glacière ou s'il est chauffé, la ligne de précipitation de la protéine s'étale en gardant la courbure lente mais en ayant une autre courbure dans la zone β_1 voire même une troisième de mobilité α .

— Dans les sérums vieillis, la β_1A globuline donne une seule courbure de mobilité franchement β_1 . La densité de sa ligne semble augmenter avec le temps. On retrouve l'aspect décrit primitivement.

— ZIMMER a aussi observé des relations entre cet antigène et les chaînons euglobuliniques du complément.

CHAPITRE II

CARACTÈRES PHYSICOCHIMIQUES

La β_1A/β_1C globuline est une glycoprotéine de nature euglobulinique, se présentant lors de l'analyse immuno-électrophorétique sous forme d'une ligne de précipitation à deux courbures, de mobilité électrophorétique β_1 .

1) Poids moléculaire.

Il n'a pas été encore déterminé avec précision. La partie protéinique de cette glycoprotéine n'est pas connue entièrement. D'après MULLER-EBERHARD, la β_1C aurait un poids moléculaire supérieur à la β_1A globuline. L'hypothèse qu'une fraction est dimère de l'autre est fort discutable.

La β_1A/β_1C globuline présente une structure tertiaire et quaternaire complexes.

2) Composition chimique.

La β_1A et la β_1C globulines contiennent un taux de glucides relativement bas. Les constituants glucidiques y sont très semblables tant au point de vue quantitatif qu'au point de vue qualitatif.

a) Partie glucidique (137).

Elle représente : 2,73 p. 100 de la protéine pour la β_1C .

2,67 p. 100 de la protéine pour la β_1A .

Protéine	Hexose p. 100	Fucose p. 100	Hexosamine p. 100	Acide sialique p. 100
β_1C	1,80	0,16	0,48	0,45
β_1A	1,70	0,15	0,55	0,42

b) *Partie protéinique* (189).

Elle constitue les 97 p. 100 de la molécule et contient tant pour la β_1A que pour la β_1C :

5,5 p. 100 de tyrosine,

1,7 p. 100 de tryptophane.

La β_1A/β_1C globuline ne contient pas de lipides.

3) **Constantes physiques.**

a) *Coefficient d'extinction ou extinction spécifique.*

$$\begin{array}{rcl} & 1 \text{ p. } 100 & \\ E & & 280 \text{ m}\mu = 101 \\ & 1 \text{ cm} & \end{array}$$

b) *Constante de sédimentation.*

Déterminée par ultracentrifugation, la vitesse de sédimentation est exprimée en unité SVEDBERG (= S) :

$$S = S^\circ \quad \begin{array}{l} \text{unité CGS} \\ 20 \text{ W} \end{array}$$

La β_1A et la β_1C globulines ont une vitesse de sédimentation différente :

$$\beta_1C = 9,5 \text{ S}$$

$$\beta_1A = 6,9 \text{ S}$$

c) *Mobilité électrophorétique.*

La β_1A/β_1C globuline précipite sous une ligne à deux courbures, la deuxième courbure étant labile et se transformant progressivement en β_1A globuline ; on ne peut déterminer une valeur de la mobilité électrophorétique de cette protéine, même si on travaille dans des conditions expérimentales absolument identiques.

On dira que la β_1A/β_1C globuline a une mobilité électrophorétique β_1 variable, la fraction β_1A étant beaucoup plus rapide que la fraction β_1C .

4) **Caractères chimiques.**

A) SOLUBILITÉ.

Les β_1A et β_1C globulines sont des euglobulines, elles sont insolubles dans l'eau et les solvants de faible force ionique, les solutions de sulfate d'ammonium 1,8 M.

Elles sont précipitées par :

- l'éthanol
- les solutions de sulfate d'ammonium 1,42 M.
- les solutions de rivanol 0,0065 M
- les solutions d'acide perchlorique 0,6 M.
- les solutions d'acide trichloracétique 0,15 M.

B) CARACTÉRISTIQUES PARTICULIÈRES.

1) *Transformation de la β_1C globuline en β_1A globuline.*

La β_1C globuline est présente uniquement dans le sérum frais et constitue, dans l'immuno-hémolyse, une partie de la forme active du troisième composant du complément. Elle est transformée en β_1A globuline, forme sérologiquement inactive, de façon progressive et homogène. Cette dégradation de la β_1C en β_1A globuline n'est pas spontanée, lorsque la protéine est en solution purifiée.

a) *Par vieillissement du sérum*, la β_1C globuline se transforme en β_1A globuline :

- 8 à 24 heures à la température de 20° C
- 48 à 72 heures à la température de 37° C
- 1 à 4 semaines entre 0 et 4° C
- Plusieurs mois à —20° C.

Cette transformation serait due à l'action d'un facteur sérique labile : la C_1 estérase qui existe normalement dans le sérum frais sous forme de proenzyme et à l'action simultanée des ions magnésium (Mg^{++}) (169).

On peut provoquer aussi la transformation de la β_1C globuline sérique en β_1A par action :

- b) *de certains agents chimiques* : zymosan extrait de *Saccharomyces Cerevisiae* (138), hydrazine (140).
- c) *des enzymes protéolytiques* (197).
- d) *du chauffage du sérum.*

2) *Modification de la β_1A/β_1C globuline après destruction du complément sérique.*

Lorsque on décomplémente le sérum par chauffage à 56° C pendant 30 minutes, pour MULLER-EBERHARD (138), il n'y aurait aucune modification : la β_1C existe toujours. Pour ZIMMER (227), le chauffage du sérum à 56° C entraîne une altération de la protéine : l'arc rapide

disparaît après dix minutes d'exposition à 56° C, alors que la courbure lente résiste pendant trente à quarante minutes.

3) *Inhibition de la transformation de la β_1C en β_1A globuline.*

La transformation de la β_1C en β_1A globuline ne se produit plus en présence (11) :

- d'un précipité spécifique albumine-antialbumine d'œuf,
- d'esters peptidiques de synthèse,
- de L acétyl L tyrosine éthyl ester.

Ces composés n'empêchent cependant pas la perte d'activité complémentaire, par vieillissement du sérum.

C) AUTRES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES (138).

a) L'addition de dérivés sulfhydriques à une solution de β_1C globuline 9,5 S entraîne l'apparition d'un composé 7 S, ressemblant à la β_1A globuline.

b) En solution dans du mercaptoéthanol 0,1 M à pH 7,08, la β_1C globuline soumise après 24 heures à 20° C à l'ultracentrifugation montre que la solution est constituée par 80 p. 100 d'un dérivé 9,5 S, et 20 p. 100 d'un composé 7 S, plus rapide au point de vue mobilité électrophorétique.

c) La β_1C globuline est beaucoup plus stable en solution pure qu'elle ne l'est dans le sérum. La β_1A globuline est stable dans le sérum humain.

5) **Caractères immunologiques.**

La spécificité d'une molécule antigénique n'est pas conférée par sa structure chimique globale mais par un ou plusieurs sites ou déterminants antigéniques. Le site antigénique est donc déterminé par la conformation précise de parties limitées situées à la surface de la molécule. Une molécule antigénique comporte en général plusieurs déterminants ou motifs antigéniques identiques ou différents.

La combinaison antigène-anticorps est une réaction spécifique : les sites des anticorps s'adaptent exactement sur les sites antigéniques. Le nombre de sites déterminent la valence de l'anticorps ou de l'antigène. En immunologie, l'union de deux éléments n'est pas stœchiométrique ; la composition du complexe formé varie selon les quantités relatives d'antigènes et d'anticorps. Lorsque les antigènes et les anticorps correspondants sont en présence, la multivalence des premiers et des seconds entraîne la formation d'un

réseau où alternent régulièrement les molécules d'antigènes et d'anticorps. Dès que ce réseau atteint une dimension suffisante un précipité apparaît.

Les β_1A et β_1C globulines présentent des caractères antigéniques communs.

Lors de l'étude par immuno-électrophorèse elles précipitent sous une ligne *continue* à double courbure.

Pour MULLER-EBERHARD qui a étudié ces protéines suivant la technique d'OUCHTERLONY, elles seraient semblables au point de vue immunologique, mais non identiques ; l'antigène lent ou β_1C globuline serait plus complet que l'antigène rapide ou β_1A : c'est-à-dire que la β_1C posséderait une valence antigénique supérieure à celle de la β_1A globuline (138).

CHAPITRE III

MÉTHODES DE PRÉPARATION

Trois méthodes sont utilisées.

A) *Méthode de SCHULTZE (138).*

Il isole la β_1A/β_1C globuline à partir du sérum frais en le traitant par du rivanol et une solution de sulfate d'ammonium.

La purification et la séparation des deux globulines sont effectuées par ultra-centrifugation et électrophorèse de zone.

B) *Méthode de STEINBUCH (197).*

Après avoir purifié le sérum frais par absorption sur de la bentonine, cet auteur précipite les β_1 globulines par le rivanol, et isole les β_1A et β_1C de ce précipité par ultracentrifugation et électrophorèse.

C) *Méthode de MULLER-EBERHARD (138).*

Elle est basée sur la nature euglobulinique de ces deux glycoprotéines. Elles précipiteront avec les euglobulines du sérum, alors que les deux autres β_1 glycoprotéines, hémopexine et sidérophiline, sont les pseudoglobulines.

La β_1A et la β_1C globuline sont obtenues sous forme hautement purifiée après chromatographie sur T.E.A.E. (triéthyl-aminoéthyl) cellulose échangeuse d'ions et électrophorèse de zone.

L'ultracentrifugation et l'analyse immuno-électrophorétique permettent le contrôle des opérations et surtout de suivre le degré de purification.

CHAPITRE IV

MÉTHODES DE DOSAGE

La β_1A/β_1C globuline représente 1 à 1,8 p. 100 des protéines sériques totales.

A) *Electrophorèse* (130).

Si on effectue l'électrophorèse dans des conditions expérimentales particulières (29, 116) :

- les lipoprotéines migrent dans la zone des α_2 globulines,
- la β_1C migre dans la zone β_2 en donnant une bande distincte qui n'existe pas si le sérum est vieux ou traité par l'hydrazine.

B) *Immuno-diffusion suivant la technique de OUDIN* (53).

C) *Dilution radioisotopique* (104).

D) *Méthode de MANCINI ou immunodiffusion radiale* (131).

C'est cette technique que nous utilisons pour le dosage *global* de la β_1A/β_1C globuline.

Le dosage par immunodiffusion de la β_1A/β_1C globuline est basé sur le fait que la β_1A et la β_1C ont des caractères antigéniques communs.

La teneur des sérums de référence est déterminée grâce à une globuline β_1A purifiée.

Par cette méthode le taux sérique moyen de la β_1A/β_1C globuline, chez les adultes normaux, est de 1400 ± 220 mg/l).

CHAPITRE V

LIEUX DE SYNTHÈSE

Les lieux de synthèse des protéines plasmatiques sont déterminés après perfusion ou incubation d'organe isolé ou après culture cellulaire, par immuno-fluorescence ou autoradiographie.

1) Jusqu'à aujourd'hui, la β_1A/β_1C globuline a été mise en évidence dans :

- les ganglions lymphoïdes (4),
- la rate (12),
- la moelle osseuse,
- les poumons (en quantité négligeable).

2) Chez les sujets sains, sa présence n'a pas été décelée au niveau :

- du foie (5-7),
- du cerveau,
- des reins,
- du cœur,
- du thymus,
- de l'intestin (16),
- des surrénales.

Des variations dépendant de facteurs génétiques n'ont pas été signalées. On ne connaît aucun allotype de cette protéine.

Certains auteurs ont amorcé l'étude du turn-over de cette glycoprotéine (6). Il n'est pas encore déterminé avec précision jusqu'à ce jour.

3) On trouve la β_1A/β_1C globuline à l'état normal (40) dans :

- le liquide céphalorachidien mais à l'état de traces (18),
- la salive,
- le liquide synovial à un taux de 11,2 p. 100,
- le lait (11).

Elle n'existe pas dans l'urine des sujets sains.

CHAPITRE VI

ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA β_1A/β_1C GLOBULINE

A. — Le complément.

1) DÉFINITION.

Le complément appelé autrefois « alexine », est un système formé de plusieurs globulines sériques réagissant dans un ordre déterminé (166). Le complément existe normalement dans tout sérum animal à l'état potentiel capable d'être activé par certaines classes d'immuno-globulines IgG et IgM quand celles-ci ont fixé un antigène spécifique. Le complément n'a pas de spécificité immunologique. Son action la plus connue est son effet cytocide (bactériolyse, hémolyse); il intervient encore dans d'autres réactions immunologiques : congélation, immuno-adhérence, chimiotactisme, hypersensibilité type Arthus.

Dans certains cas les γ -globulines ont la propriété de fixer le complément (33) d'une manière analogue à celle des complexes antigène-anticorps. Ce fait, observé depuis longtemps (49), est inconstant. Actuellement, la différenciation des γ -globulines en plusieurs classes (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE) et la possibilité de leur scission moléculaire en sous-unités permettent d'étudier chacune d'elles isolément et d'identifier les éléments structuraux responsables de cette attraction anticomplémentaire. Ces sites de fixation du complément sont différents des sites anticorps.

- Les IgA n'ont pas de pouvoir anticomplémentaire (13).
- Les IgG possèdent cette propriété dans certaines conditions (37, 133).
- En ce qui concerne les IgM, les avis sont partagés (33).
- Les IgD et les IgE n'ont pas encore été étudiés dans ce sens.

L'action anticomplémentaire serait due aux agrégats 10 S quand les IgM et les IgG en contiennent. Cette action est prépondérante sur les fractions C_2 et C_4 du complément.

2) LES FACTEURS DU COMPLÉMENT.

L'intervention de nombreux facteurs sériques (179) traduit la complexité de l'action du complément dans les phénomènes immuno-logiques.

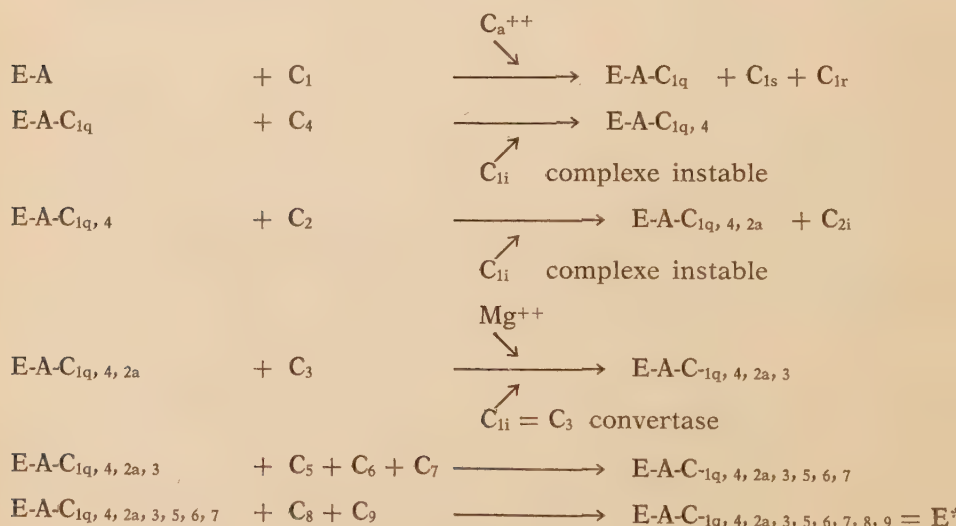
Découverts et définis en 1896 par BORDET, ce n'est que depuis 1955 que des immunochimistes tels MAYER, NELSON, LEPOW et MULLER-EBERHARD (148-142) ont purifié les composants du complément.

Schématiquement, le système complémentaire est constitué de neuf composants actuellement désignés par les symboles : C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , qui interviendraient lors de l'immuno-hémo-lyse ou cytolyse. Autrefois, les symboles utilisés pour désigner ces fractions étaient C'_1 , C'_2 , etc...

Quand on met en présence des hématies et des anticorps anti-hématies par réaction immunologique spécifique, on assiste à la formation d'un complexe « E-A » capable de fixer le complément. On dit que les hématies sont sensibilisées.

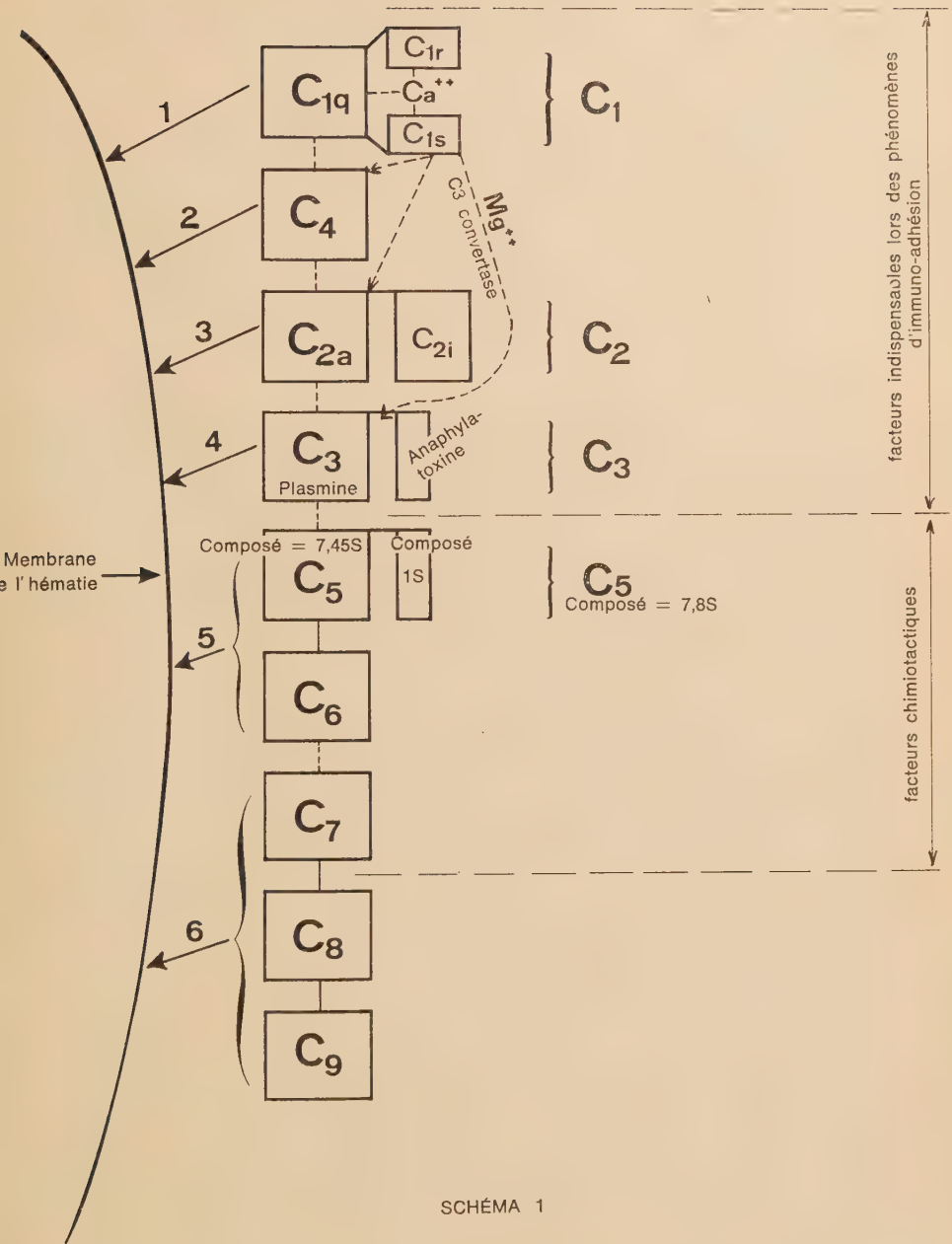
La fixation des constituants du complément s'effectue en six étapes successives (schéma 1).

Les différentes étapes de la réaction de la fixation du complément s'écrivent ainsi :



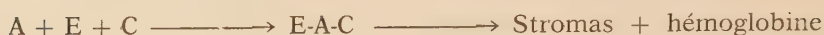
Les hématies sont lésées.

La destruction des hématies constitue le dernier stade de cette immuno-hémolyse.



Fixation des composants du système complémentaire

L'équation globale de la réaction se schématise ainsi :



Dans la séquence des réactions indiquées, on a :

E = Erythrocytes (en pratique hématies de mouton).

A = Anticorps anti-hématies (sérum hémolytique de lapin).

$E-A$ = Complexe érythrocyte — Anticorps anti-hématies (représentant l'hématie sensibilisée).

C_1 = Premier composant du complément (= C) (schéma 2)

C_{1q} = partie de C_1 sérologiquement active,

C_{1s} = partie de C_1 sérologiquement inactive.

Remarque : C_{1s} , possède des propriétés estérases, active les fractions C_4 , C_2 , C_3 . Des inhibiteurs physiologiques de cette action estérasique entrent en jeu pour éviter l'hydrolyse complète de ces fractions avant leur fixation sur le complexe « E-A- C_{1q} ».

La C_1 estérase (123) co-facteur du premier composant du complément n'a pas d'activités hémolytiques (174-175-124). L'hypothèse que un ou plusieurs composants du complément sont des enzymes a été avancée depuis longtemps.

Cette théorie a été exprimée par LEVINE (127) qui avait observé que le D.F.P. ou diisopropylfluorophosphate, inhibiteur des estérases, supprimait le pouvoir hémolytique du complément. C'est à BECKER (21) que l'on doit confirmation que C_1 est une proestérase dans le sérum frais. La C_1 estérase se comporte comme une enzyme clivante à la surface des immun-complexes.

C_4 = quatrième facteur de C (= β_1E globuline)

C_2 = deuxième facteur de C

C_3 = troisième facteur de C (= β_1C globuline)

C_5 = cinquième facteur de C (= β_1F globuline)

C_6 = sixième facteur de C (= β_1H globuline)

C_7 = septième facteur de C

C_8 = huitième facteur de C (= α_2 globuline)

C_9 = neuvième facteur de C (= α_2 globuline).

E^* = hématie lésée.

Au microscope électronique on observe sur les membranes cellulaires de ces hématies des figures anormales, arrondies de 8 à 10

millimicrons de diamètre qui sont interprétées comme des « trous » par lesquels s'écoulerait l'hémoglobine.

Des études chromatographiques ont montré l'existence de co-facteurs ou sous-fractions. Ainsi le C_1 (125-126) est formé de trois co-facteurs de C_{1q} , C_{1r} , C_{1s} ; seul C_{1q} est actif sérologiquement (schéma 2). De même le C_3 humain (129) est constitué de quatre co-facteurs : C_{3a} , C_{3b} , C_{3c} , C_{3d} ; un de ces co-facteurs C_{3a} (202-203) où C_{3c} serait représenté par la β_1C globuline. La partie sérologiquement inactive de C_3 est appelée anaphylatoxine₁. Cette anaphylatoxine₁ peut être obtenue à partir de C_3 par action de différentes substances (schéma 3). La partie sérologiquement active de C_3 est représentée par la plasmine (schéma 4).

Malgré les nombreux essais pour l'expliquer, le mécanisme chimique par lequel le complément agit à la surface des érythrocytes est encore inconnu ; des lécithinases pourraient intervenir. Il est donc prématuré d'attribuer une signification physiopathologique valable au complément tant que sa nature chimique, son lieu de production, le mécanisme contrôlant sa synthèse et l'activité chimique de chacun des composants restent inconnus.

3) VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DU TAUX SÉRIQUE DU COMPLÉMENT.

Malgré les restrictions sur l'intérêt physiologique des variations du complément, sa détermination peut apporter une information supplémentaire et permettre d'étayer un diagnostic clinique. Jusqu'à présent, les dosages du complément ne sont pas entrés dans la pratique des analyses médicales courantes ; les méthodes de détermination jusqu'à ces deux dernières années ne donnaient pas toujours des résultats reproductibles.

a) Variations physiologiques (77).

Chez les sujets sains, le taux sérique du complément est assez stable.

Il faut toutefois noter l'existence de sérums qui possèdent une activité anticomplémentaire naturelle.

Chez le nouveau-né, le taux du complément sérique est de l'ordre de 50 à 60 p. 100 de celui de l'adulte. Il n'atteint sa valeur normale que vers le quatrième mois.

Avec l'âge, il augmente un peu.

Le taux du complément ne présente pratiquement pas de différence suivant le sexe de l'individu.

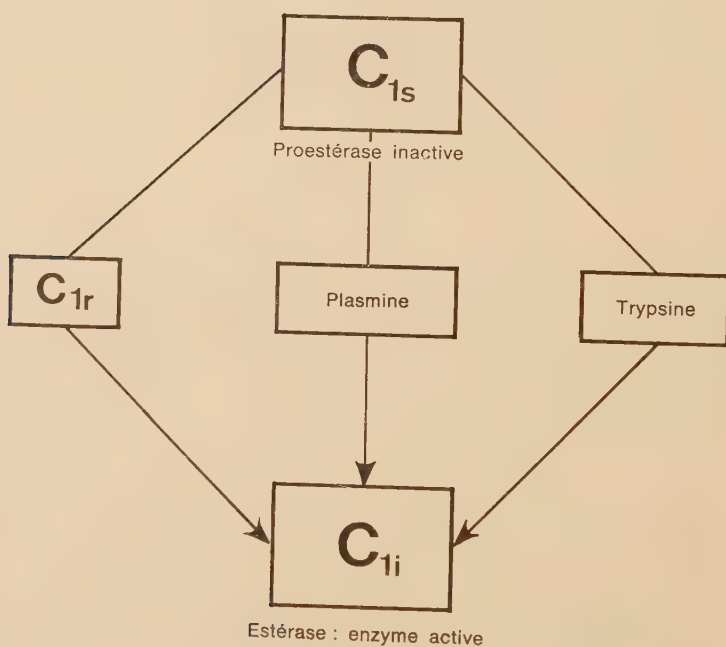
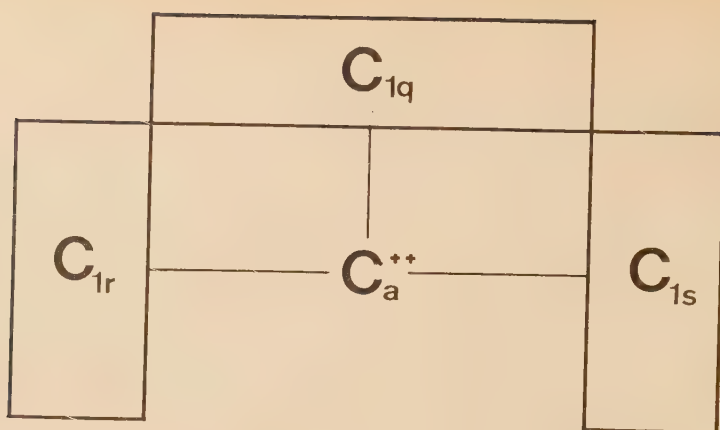


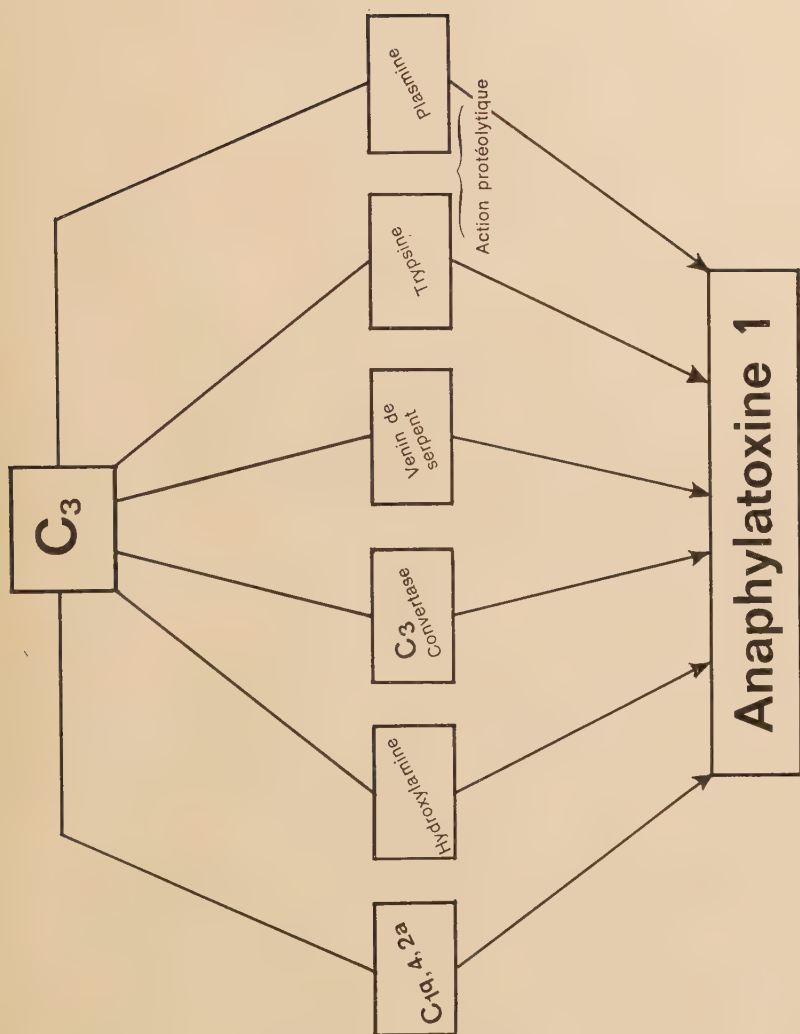
SCHÉMA 2

Représentation schématique de la molécule de C_1

C_{1q} = co-facteur de la première fraction du complément active sérologiquement.
 C_{1s} = proestérase. C'est l' α_2 neuraminidase glycoprotéine de SCHULTZE. Cette protéine contient 17 p. 100 d'acide sialique.

C_{1r} = prothéase différente de C_{1s} au point de vue :

- thermostabilité,
- et nature des substrats.



SCHEMA 3

Obtention de l'anaphylatoxine₁ à partir du C₃

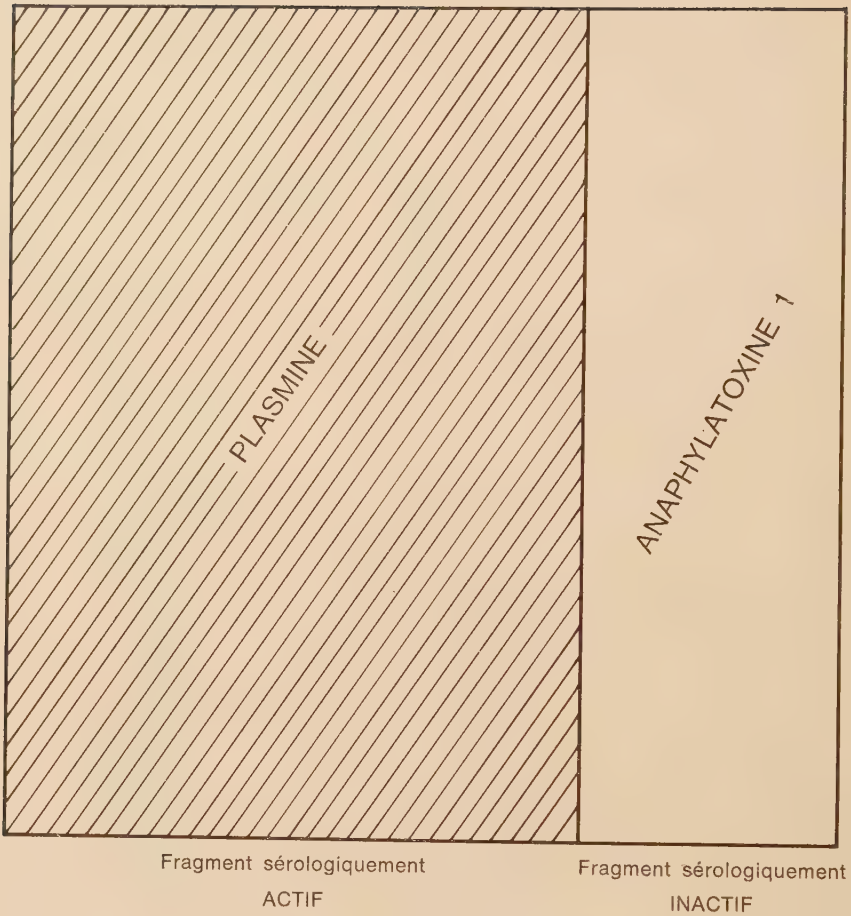


SCHÉMA 4

Molécule de C_3

b) Variations pathologiques.

α) ANOMALIES CONGÉNITALES (105-205)

Elles sont rares.

1°) Œdème angioneurotique héréditaire (14).

Cette maladie décrite pour la première fois par OSLER en 1888, s'accompagne d'un déficit en complément. Il y aurait déficience d'un inhibiteur sérique de la C_1 estérase, qui n'étant plus inhibée, va non

seulement activer les autres composants du complexe, mais aussi les hydrolyser complètement avant qu'ils ne soient fixés sur le complexe E-A-C_{1q}.

2°) *Déficit héréditaire en C₂ (50).*

Dix cas de ce syndrome ont été décrits depuis 1960. Ces affections congénitales sont accompagnées d'une hypocomplémentémie.

3°) *Hypogammaglobulinémie avec déficit en C₁ (47).*

β) ANOMALIES ACQUISES

1°) *Hypercomplémentémies.*

Elles sont fréquentes, incluses dans le syndrome humoral de la phase aiguë des maladies infectieuses d'après certains auteurs.

Localement, l'agression infectieuse déclenche le processus inflammatoire grâce à des substances d'origine microbienne ou tissulaire. Ces substances agissent « in situ ». Mais une partie de celles-ci va pouvoir diffuser dans l'organisme et entraîner des réactions inflammatoires généralisées. Ces réactions sont :

— d'ordre clinique : syndrome infectieux, mise en jeu des barrières naturelles, formation de pus, de ganglions, apparition de la fièvre.

— d'ordre biologique : syndrome humoral (augmentation de la vitesse de sédimentation de l'haptoglobine et des α_2 globulines en général, de la fibrine, des transaminases et lacticodéshydrogénase, du complément, apparition de la C.R.P. ou protéine C réactive), auquel on ajoute les réactions cellulaires (hyperleucocytose avec lymphocytose ou polynucléose).

Nous allons voir cependant que certaines maladies dont une des caractéristiques fondamentales, est un processus inflammatoire généralisé, peuvent être accompagnées d'un taux sérique du complément normal ou diminué.

L'hypercomplémentémie se rencontre au cours d'affections très différentes :

- ictères par rétention,
- diabète,
- amylose,
- certains processus inflammatoires.

2°) *Hypocomplémentémies.*

Elles peuvent relever de trois mécanismes :

— *Fixation de complément in vivo.*

Dans le lupus érythémateux disséminé (LED) (112).

Les endocardites subaiguës.

Les septicémies.

Le cas de rejet des homogreffes.

Les anémies hémolytiques.

Presque toutes les maladies hétéroimmunes.

Sur les complexes antigène-anticorps ou uniquement sur les anticorps, ou les deux successivement.

Dans la polyarthrite chronique évolutive (P.C.E.) la valeur du complément est normale dans le sang, alors qu'elle est diminuée dans les liquides synoviaux.

— *Diminution de la synthèse du complément.*

Une hypocomplémentémie est assez constante dans les atteintes graves du foie et dans les cas de dénutrition.

— *Déperdition du complément (par complémenturie).*

Ce mécanisme serait en cause dans les glomérulonéphrites aiguës ou subaiguës.

Pour certains auteurs, une diminution de la synthèse serait aussi associée à cette déperdition.

Quoi qu'il en soit, on peut affirmer qu'en pathologie, le taux sérique du complément subit d'importantes variations répondant à des mécanismes divers :

— un défaut de synthèse,

— une réaction antigène-anticorps (176),

— la présence d'une substance anticomplémentaire,

— une élimination rénale (113).

En pathologie rénale, une élimination urinaire ou complémenturie, est bien établie au cours de certains cas graves de glomérulonéphrites prolifératives (32).

B. — Relation entre la β_2 C globuline et le complément.

C'est MULLER-EBERHARD (139) qui, le premier, a établi les relations entre la *fraction lente* ou β_2 C globuline de la β_1 A/ β_2 C globuline et le troisième composant du complément (C_3). L'addition de petites

quantités de cette protéine à un sérum de cobaye privé de C_3 par le réactif « R_3 » (préparé à partir d'une suspension de zymosan et de sérum) lui rend son pouvoir hémolytique. Les faits sont plus compliqués en ce qui concerne le sérum humain (134, 141, 143).

PEETOM (165) a montré sur du sérum sanguin humain la correspondance entre la ligne de précipitation β_1C et la ligne de précipitation formée avec un immun-sérum spécifique de lapin anti-complément humain.

Plusieurs hypothèses ont été avancées :

1) La β_1C globuline pourrait fixer la fraction C_3 (198).

2) L'activité de la β_1C globuline est semblable à celle du complément C_3 .

Le troisième composant du complément pourrait être assimilé à la β_1C globuline, la partie non utilisée se transformerait en β_1A globuline inactive au point de vue sérologique (181).

3) Pour d'autres auteurs la β_1C ne représenterait que la moitié de l'activité de C_3 (173). La β_1C globuline ne serait qu'un co-facteur de C_3 et se transformerait en β_1A globuline de façon non spécifique. La β_1A inactive sérologiquement, résulterait d'une dénaturation irréversible de la β_1C substance native.

Il est vraisemblable que la β_1C globuline ne représente qu'une partie de l'activité C_3 . Une solution pure de β_1C globuline rend au sérum de cobaye privé de C_3 son pouvoir hémolytique total alors qu'elle ne le rend pas à du sérum humain privé de C_3 . Le sérum de cobaye ne contient en effet qu'un seul co-facteur de C_3 (122), tandis que le sérum humain en contient quatre (C_{3a} , C_{3b} , C_{3c} , C_{3d}).

CHAPITRE VII

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA β_1A/β_1C GLOBULINE

A. — Variations physiologiques.

Le taux de la β_1A/β_1C varie en fonction :

a) *du sexe.*

D'après LUNDH, le taux sérique chez l'homme serait plus élevé que chez la femme (130).

b) *de l'âge.*

La β_1A/β_1C globuline n'a pu être mise en évidence durant la vie fœtale par analyse immuno-électrophorétique (89). Cependant, une activité complémentaire existe, c'est-à-dire que C_3 est présent durant la vie fœtale. Le complément serait synthétisé par le fœtus.

La β_1A/β_1C globuline existe mais à un taux faible chez le nouveau-né (57), puis s'accroît pour atteindre une valeur identique à celle de l'adulte dès le neuvième mois après la naissance (89).

La β_1A/β_1C globuline apparaît donc très tôt avant certaines immunoglobulines et peut atteindre, selon certains auteurs, des concentrations importantes chez le nourrisson.

B. — Variations pathologiques.

À côté d'une variation sérique du taux de la β_1A/β_1C globuline au cours de certaines maladies, on note une présence anormale de celle-ci dans l'urine et au niveau de tissus lésés.

La valeur sérique de cette glycoprotéine varie principalement lors :

- d'affections hépatiques,
- du Lupus érythémateux disséminé et des Collagénoses,
- de certaines formes de glomérulonéphrites.

1. — AFFECTIONS HÉPATHIQUES.

— Lors des affections hépatiques d'origine inflammatoire virale ou éthylique (78) on note à côté d'une augmentation globale des immunoglobulines (IgG, IgM, IgA) une diminution de la β_1 A globuline.

— Ces modifications n'existent pas dans les ictères par atteinte des voies biliaires extra-hépatiques, mais cependant elles n'ont pas de spécificité étiologique. Ces variations existent quelle que soit la cause du processus inflammatoire, elles ne sauraient témoigner d'une atteinte hépatique, car on les rencontre au cours d'autres affections inflammatoires, telles :

- La mononucléose infectieuse = M.N.I.
- La polyarthrite chronique évolutive = P.C.E. = Maladie de STILL.
- La sclérose en plaque = S.E.P.
- Les réticuloses.
- Rhumatisme articulaire aigu = R.A.A. (89).

Ces anomalies protéiniques sont la marque d'une atteinte du système réticulo-endothélial, quelles que soient la cause et la localisation.

— Dans les cas de cirrhoses hyperprotidémiques, et d'ictères graves, surtout d'origine virale, la plupart des β_1 globulines sont diminuées.

Au cours de l'hépatite lupoïde une diminution de la β_1 A globuline accompagnée d'une augmentation des γ A globulines est un des signes biologiques spécifiques (36).

2. — LUPUS ERYTHÉMATEUX DISSÉMINÉ (= L.E.D.) ET AUTRES COLLAGÉNOSES.

La diminution du taux du complément lors des maladies par autoanticorps est fréquente (195).

La forte diminution de la β_1 A/ β_1 C globuline constitue le trouble fondamental et constant dans le L.E.D.

En 1958, SÉLIGMAN avait constaté au cours de cette maladie, la coexistence de certains anticorps circulants (anti DNA) et d'une chute de la β_1 A globuline. Cet auteur avait suggéré alors un rapport entre cette globuline et le complément (194-194).

Dans une étude immuno-électrophorétique, portant sur 71 sérums de malades présentant des syndromes néphrotiques individualisés

dont 47 étaient atteints de L.E.D., GRABAR, BURTIN, SÉLIGMAN (192) ont rapporté les résultats suivants :

Malades en période	Nombre de cas	β_1A/β_1C globuline		
		diminuée		normale
		fortement	notablement	
évolutive	42	35	7	0
d'amélioration	22	2	14	6
de rémission	7	0	1	6

Chez quelques malades que ces auteurs ont pu suivre aux différents stades de la maladie, la teneur du sérum en β_1A globuline reflète assez fidèlement l'évolution de l'affection.

Il n'y a pas de corrélation entre la diminution de la β_1A globuline et l'augmentation des immuno-globulines γG et γA .

La diminution du taux sérique du complément est en relation avec la forme clinique de la maladie et la gravité des lésions rénales (206), tout comme la diminution de la β_1A globuline (218). Ces deux diminutions liées entre elles constituent un élément de gravité du pronostic (58).

Dans les cas de L.E.D. la diminution de la β_1A globuline est un signe biochimique qui peut permettre d'étayer un diagnostic, mais elle constitue surtout un critère pour suivre l'efficacité du traitement par les corticoïdes ou les immuno-dépresseurs (219). Son retour à la valeur normale semble un témoin fidèle d'une évolution favorable.

Des études récentes ont montré que la diminution de la β_1A globuline existe dans 70 p. 100 des cas de L.E.D. surtout quand ils sont accompagnés de lésions rénales type glomérulonéphrites prolifératives (172).

Cependant, lors de toutes les « Collagénoses », on peut observer un effondrement, voire même une disparition de cette protéine.

Malgré le manque de spécificité, certains auteurs (146), préférèrent s'appuyer sur la diminution de la β_1A globuline comme signe biologique du L.E.D. plutôt que sur la diminution de l'activité sérique du complément, les sérums de lupiques étant assez fréquemment anticomplémentaires.

Les causes de diminution de la β_1A/β_1C globuline sérique sont encore mal connues. Il pourrait s'agir d'une fixation de la β_1C avec le complexe antigène-anticorps soit sur les lésions rénales (214), soit

sur les lésions vasculaires diffuses s'il n'y a pas de lésions rénales (154). La fixation de la β_1C est faible par rapport à la diminution sérique. Ce mécanisme n'est probablement pas le seul en cause.

3. — GLOMÉRULONÉPHRITES.

La mise en évidence de la participation du complément dans les réactions immunes responsables de lésions rénales a été rapportée pour la première fois par GUNN en 1915 (72).

La complémenturie était jusqu'alors inconnue. Par la suite cependant, la présence de la β_1C globuline a été signalée dans les urines de sujets atteints de glomérulonéphrites hypocomplémentaires (111, 151, 115), mais en quantité si minime qu'elle est jugée en tout cas insuffisante pour expliquer entièrement la baisse de la β_1C dans le sérum.

Une diminution du taux sérique de la β_1C a été observée dans des cas de glomérulonéphrites prolifératives aiguës alors qu'elle présente une valeur normale au cours (217, 95, 224) :

- des néphroses lipoïdiques,
- des pyélonéphrites anaphylactiques,
- des hématuries congénitales idiopathiques,
- des syndromes néphrotiques,
- des glomérulonéphrites extra-membraneuses,
- des glomérulonéphrites chroniques.

Dans le sérum de sujets atteints de néphrites aiguës on peut noter la présence d'un corps qui précipite à froid et qui se redissout à 37° C. Ces complexes, appelés cryoglobulines, précipitant à froid, contiennent toujours des γ globulines G et de la β_1C globuline et quelquefois on trouve des immuno-globulines IgA et IgM.

Des biopsies rénales chez ces malades ont révélé la présence de dépôts granuleux de β_1C et IgG le long des glomérules (71).

Dans ces formes aiguës de glomérulonéphrites, la signification de l'existence de cryoglobulines sériques n'est pas encore connue. La présence simultanée de la β_1C et des IgG au niveau des cryoglobulines sériques et des glomérules peut faire penser à un phénomène immuno-pathologique.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION

CHAPITRE I

MÉTHODES UTILISÉES

A) IMMUNO-ELECTROPHORESE

I. — PRINCIPE.

a) Généralités — Historique.

Le principe de la précipitation immunologique, phénomène observé pour la première fois par KRAUS (109), a été appliqué par la suite dans un très grand nombre d'études.

La mise au point de la méthode d'immuno-diffusion par OUDIN (158) suivant laquelle la précipitation de l'antigène par l'anticorps correspondant s'effectue dans un gel, apporta le progrès technique décisif. Cette méthode permet de différencier les antigènes d'un mélange hétérogène tel que le plasma ou le sérum humain, en tirant parti de leurs différentes vitesses de diffusion dans un gel. Dans les cas de solutions d'antigènes de composition hétérogène et d'anti-sérums multivalents, on observe des précipitations en plusieurs couches lors de la diffusion des antigènes et des anticorps en sens opposé (double diffusion).

La méthode des plaques d'agar d'OUCHTERLONY (155, 156, 157) constitue un perfectionnement de la technique de diffusion dans un gel. Suivant cette technique, on coule sur des plaques de verre, de l'agar en couche d'épaisseur uniforme, que l'on transperce de trous : les uns seront remplis de solution d'antigènes, les autres de solution d'anticorps. Au bout d'un certain temps, au point de rencontre des antigènes et des anticorps correspondants, il se forme des immuno-précipités se présentant généralement sous forme d'arc. Cette technique a trouvé un vaste domaine d'application (167, 48, 98, 15) dans l'étude des problèmes de biologie médicale, parce qu'elle donne toute latitude dans la répartition et la combinaison des antigènes et des antisérums. Il n'est cependant pas possible de s'étendre sur les multiples facteurs qui influencent l'apparition des lignes, leur

nombre, leur situation, leur évolution ; ces variables ont fait l'objet de nombreuses recherches, en particulier par Madame KAMINSKI (102, 180).

On peut admettre que chaque ligne de précipitation représente un complexe antigène-anticorps au moins, sous deux réserves : la possibilité d'une superposition de plusieurs complexes et éventuellement le dédoublement d'une ligne unique de précipitation.

La méthode de l'immuno-électrophorèse mise au point par GRABAR et WILLIAMS (63) est une synthèse de deux techniques de recherche, l'une physico-chimique, l'autre immuno-chimique ; ces deux types d'analyse s'appliquent sur un seul et même support. Dans un gel d'agar, les mélanges des protéines se trouvant dans les extraits, exsudats ou humeurs organiques sont soumis en premier lieu à une électrophorèse qui, dans le cas du sérum, sépare en six groupes les constituants de l'échantillon ; on révèle ensuite spécifiquement chaque constituant au moyen d'une réaction immuno-logique après diffusion et précipitation par un antisérum. La micro-méthode de SCHEIDEGGER (183) basée sur ce même principe est actuellement la plus utilisée.

L'immuno-électrophorèse (15, 64, 65, 34) a permis jusqu'à présent d'obtenir dans le sérum humain normal environ 30 lignes de précipitation différentes caractérisant pour le moins, autant de protéines individuelles (187).

Bien que récente, l'analyse immuno-électrophorétique a pris une telle extension qu'elle est utilisée non seulement pour les travaux relevant du domaine de la chimie des protéines, mais encore pour l'étude des problèmes cliniques les plus divers posés par le métabolisme des protéines (225, 42, 85) : plasmocytomes, macroglobulinémies de WALDENSTRÖM (213), différentes formes de syndrome de déficience en anticorps maladies congénitales de carences protéiniques. L'immuno-électrophorèse convient également à l'étude de certaines protéines plasmatiques ayant une fonction de transport, et elle permet aussi la détermination des groupes sériques.

L'immuno-électrophorèse, méthode d'analyse qualitative, permet d'estimer approximativement des augmentations ou des diminutions portant sur les protéines sériques : c'est une méthode semi-quantitative.

Lors de l'analyse immuno-électrophorétique on effectue, en milieu gélifié, dans un premier temps une séparation électrophorétique des constituants, puis on fait diffuser, dans une direction perpendiculaire, un immun-sérum spécifique.

L'analyse immuno-électrophorétique proprement dite, est limitée aux techniques où les deux opérations sont effectuées sur un même

support. Néanmoins, des réactions immuno-chimiques avec des produits préalablement séparés par électrophorèse ont été réalisées depuis fort longtemps, en particulier par TISELIUS et KABAT (204).

b) L'électrophorèse en milieu gélifié (221).

— Les protéines sont des ampholytes, c'est-à-dire des molécules possédant une charge électrostatique variable en fonction du milieu. En milieu acide, les protéines portent un excès de charges positives, en milieu alcalin, un excès de charges négatives. A une valeur de pH égale ou supérieure à environ huit, toutes les protéines plasmatiques sont chargées négativement, mais le nombre de charges négatives dépendant de la structure primaire est toutefois variable d'une protéine à l'autre. C'est sur cette propriété qu'est basée la séparation électrophorétique.

— L'emploi d'un milieu gélifié, présente plusieurs avantages : sa teneur élevée en eau permet une électrophorèse analogue à celle que l'on obtiendrait en milieu liquide, tandis que sa structure ralentit la libre diffusion des substances pendant et après l'électrophorèse. De plus, le milieu est parfaitement homogène, le fractionnement est plus régulier qu'avec le papier.

— Pour obtenir des résultats convenables, il faut s'adresser à des substances qui forment, même à faible concentration, des gels véritables possédant une certaine élasticité. Ces gels doivent être aussi neutres que possible et ne contenir qu'une quantité extrêmement faible de calcium pour ne pas provoquer des phénomènes secondaires tels que l'électro-endosmose sous l'action du champ électrique pendant l'électrophorèse. L'électro-osmose consiste en un mouvement de la totalité du liquide qui imbibe le gel dans le sens opposé à celui du courant électrique. Ce mouvement est régulier et n'interfère pas avec les déplacements électrophorétiques relatifs des constituants du mélange étudié. La position d'un constituant à la fin de l'électrophorèse est donc une résultante de son transport par le courant électrique et de son déplacement par électro-endosmose.

— Ce gel doit être aqueux, milieu habituel des substances biologiques, transparent, à bas point de solidification. Ces critères sont surtout intéressants pour l'analyse immuno-électrophorétique afin que les arcs de précipitation puissent être inventoriés par des procédés photographiques.

Depuis longtemps, de nombreux auteurs, tels GORDON et collaborateurs (61), ont décrit des méthodes d'électrophorèse en milieu gélifié. Il est intéressant de remarquer que la micro-électrophorèse en milieu gélifié est aussi utilisée en tant que méthode de séparation (149).

— La gélose (110) est le support des immuno-électrophorèses le plus fréquemment utilisé, mais des immuno-électrophorèses sont également effectuées sur membrane d'acétate de cellulose (136, 70, 200), et sur gel de polyacrylamide (153, 150).

c) La précipitation spécifique, l'immuno-diffusion.

α) GÉNÉRALITÉS

La possibilité d'utiliser la réaction de précipitation spécifique pour la mise en évidence d'une substance dépend :

- 1) de son antigénicité ;
- 2) de la présence à une concentration suffisante mais non en excès de l'anticorps correspondant ;
- 3) de la concentration de cette substance.

Quelques microgrammes d'une substance peuvent être décelés. La réaction de précipitation d'un antigène par l'anticorps correspondant se fait graduellement au fur et à mesure que la diffusion met les réactifs en contact. Pour que le complexe insoluble apparaisse, il faut que l'antigène et l'anticorps se rencontrent dans certaines concentrations qui déterminent la zone d'équivalence :

— En présence d'un excès d'anticorps : les immun-complexes formés sont riches en anticorps et n'ont pas tendance à s'agréger.

— Au point d'équivalence : tous les sites d'anticorps entrent en combinaison avec tous les sites antigéniques, un réseau dense s'établit, l'immun-complexe se visualise par l'apparition d'un précipité.

— S'il y a excès d'antigène : les sites antigéniques libres sont nombreux, les immun-complexes restent solubles.

β LES ANTISÉRUMS

Ce sont les réactifs nécessaires à la révélation immuno-chimique. Ils sont loin d'avoir tous la même valeur en raison de la variabilité de réponse d'un animal à l'autre.

Le nombre et la quantité des anticorps précipitants formés chez l'animal dépendent de nombreux facteurs et principalement de :

* l'espèce de l'animal fournisseur de l'immun-sérum.

— les antisérums humains de lapin ne forment pas de complexes solubles en présence d'un excès d'antigènes.

— les antisérums humains de cheval qui sont du type flocculant, donnent des précipitations dans une zone relativement restreinte, et forment des complexes solubles en présence d'un excès d'anticorps.

- * la quantité d'antigène injectée,
- * la forme sous laquelle l'antigène est injecté,
- * la voie d'injection,
- * la périodicité de l'injection.

Le choix des antisérums dépend principalement du problème posé par chaque sérum pathologique. En général, on utilise successivement les trois immun-sérums principaux suivants :

- 1) les immun-sérums, antisérum humain normal ;
- 2) les immun-sérums mono-spécifiques dirigés contre une protéine déterminée ;
- 3) les immun-sérums, antisérum humain normal spécifiquement absorbés vis-à-vis d'une protéine.

On peut ainsi effectuer une étude globale d'un sérum et obtenir des informations précises sur protéine particulière.

De plus, l'étude des déterminants antigéniques sériques, demande plusieurs expériences avec des lots d'immun-sérums différents sur un même sérum.

γ) LES SÉRUMS DE RÉFÉRENCE

Dans tous les cas, il faut faire migrer, dans les mêmes conditions et de préférence sur la même plaque, un sérum de référence et le sérum à analyser.

Bien qu'un sérum humain lyophilisé standard convienne comme témoin, il est à noter que toutes les protéines séparables dans le sérum frais, ne sont pas présentes dans leur état naturel après lyophilisation :

— la fraction β_1C globuline est presque totalement absente ;

— les lipoprotéines et les glycoprotéines se redissolvent mal après lyophilisation ce qui peut créer un léger flou autour des arcs de précipitation respectifs. Les β -lipoprotéines sont, de plus, éliminées par conservation au froid.

d) Interprétation des résultats de l'analyse immuno-électrophorétique.

α) IDENTIFICATION DES ARCS DE PRÉCIPITATION

1°) De nombreuses observations (35, 97) ont montré que les bandes correspondantes aux précipités spécifiques formés dans un gel de gélose peuvent, dans certaines conditions, excès de réactifs par exemple, s'élargir d'abord, puis se séparer en deux ou plusieurs arcs différents même si l'antigène est pur et homogène,

S'il s'agit d'un dédoublement d'une bande, les extrémités ou les parties centrales des arcs qui se forment, restent pendant un certain minimum de temps confluentes. Dans ce cas, un seul et unique constituant est en jeu.

Par contre, lorsque les deux arcs qui se forment d'emblée, restent plus ou moins parallèles, il s'agit de deux constituants différents (les β lipoprotéines). Il en est de même dans le cas où deux arcs très voisins se croisent.

2°) De sa mobilité électrophorétique va dépendre la position occupée par l'arc de précipitation du constituant.

3°) La position de l'arc de précipitation par rapport à la source d'antigènes et sa forme peuvent fournir des indications utiles pour l'interprétation, mais sont aussi sous la dépendance des rapports antigène-anticorps : si la quantité d'antigène est de beaucoup supérieure à celle de l'anticorps, tout en restant dans la zone de précipitation, l'arc sera plus proche de la source des anticorps et inversement.

4°) L'existence d'arc allongés peut être due à deux causes : soit une rétention partielle de l'antigène, soit la présence de deux ou plusieurs substances ayant la même spécificité antigénique mais de mobilité différente : cas des γ globulines (IgG).

5°) La ligne de précipitation peut être formée de deux ou trois arcs liés entre eux : les trois ovalbumines (52), les deux sérum-albumine dans certains sérums anormaux (106), la β_1C/β_1A globuline dans les sérums humains normaux.

Les substances, dans ce cas, possèdent une même spécificité antigénique mais ont des mobilités électrophorétiques nettement distinctes, tandis que les γ globulines seraient une famille de substance appartenant à une série continue de mobilité différente.

L'interprétation des immuno-électrophorégrammes consiste à connaître à quelle protéine correspond chaque arc. Il existe plusieurs méthodes spécifiques pour identifier une ligne de précipitation donnée, en particulier des méthodes de coloration (220), de fluorescence (147), d'enzymologie (210), d'autoradiographie (177).

β) APPLICATIONS DE L'ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE

1°) *L'analyse immuno-électrophorétique pour les diagnostics cliniques.*

L'analyse immuno-électrophorétique est devenue la méthode classique pour l'étude de certains problèmes de diagnostic clinique. Elle permet, par exemple, d'établir le diagnostic de plasmocytome, plus sûrement que la simple électrophorèse sur papier (103). Au stade initial des plasmocytomes, lorsque la fraction de paraprotéine monoclonale est encore faible, les paraprotéines ne sont souvent décelables que par immuno-électrophorèse (135).

C'est aussi seulement depuis la pratique de l'immuno-électrophorèse que l'on peut faire une distinction entre les différents plasmocytomes : γ G et γ A plasmocytome.

Les anomalies immuno-chimiques des γ globulines peuvent être analysées avec une précision inconnue jusqu'alors et reconnues dans des cas où elles étaient insoupçonnées. Ces anomalies moléculaires constantes dans la maladie de KAHLER apportent une unité nosologique aux perturbations protéiques, quelle que soit la mobilité électrophorétique de la protéine anormale.

Jusqu'ici, on ne pouvait étayer le diagnostic clinique d'une éventuelle macroglobulinémie de WALDENSTRÖM que par ultracentrifugation (213). L'immuno-électrophorèse permet en utilisant un sérum anti- γ M globuline de déceler les macroglobulines présentes en quantité notablement accrue, dans la maladie de WALDENSTRÖM (43, 73).

Le taux des macroglobulines, normalement inférieur à 3 p. 100, est également accru dans certains cas de cirrhose hépatique (20, 228) et dans les syndromes de macroglobulinémie secondaire, mais de façon moins importante (taux inférieur à 10 p. 100). Dans ces cas, on détermine quantitativement la teneur en γ M globuline, par immunochimie et le taux de macroglobuline par ultracentrifugation afin d'établir un diagnostic différentiel.

Le diagnostic des différentes formes du syndrome de déficience en anticorps est facile à établir par immuno-électrophorèse surtout si on utilise des sérums spécifiques anti-immunoglobulines (138). Cette technique est la seule qui permette de déceler le syndrome de carence en anticorps dit « normogammaglobulinémie », caractérisé par une diminution des γ A et des γ M immunoglobulines ou une absence totale des deux éléments alors que la teneur globale en γ globulines est normale (139). Dans ce syndrome l'électrophorégramme du sérum peut sembler normale : la diminution des γ A et des γ M globulines est compensée par une augmentation des γ G.

L'analyse immuno-électrophorétique est la méthode de choix pour l'étude des maladies congénitales de carence protéiniques telles

que l'agammaglobulinémie (44, 66), l'analbuminémie (24), l'asidérophilinémie (83), l'abétalipoprotéinémie (114) et l'afibrinogénémie (69).

Cette technique d'analyse est utile pour les recherches concernant le métabolisme protidique en général (19) pour détecter et suivre l'évolution des nombreuses maladies acquises par carence en protéines (226), pour l'étude de la formation des protéines chez le nouveau-né (144).

En effet, pendant son évolution intra-utérine et jusqu'à la fin de la gestation le fœtus peut recevoir des protéines humaines d'origine maternelle. L'analyse des sérums des nouveau-nés peut donc fournir des renseignements précieux sur la perméabilité du placenta humain aux fractions protéiques spécifiques (88). Lors de la section du cordon ombilical, cette source de protéines disparaît et à partir de ce moment, l'enfant nouveau-né est contraint de synthétiser lui-même ses protéines. L'étude répétée du spectre protéique au cours des premiers mois de la vie permet de suivre la synthèse des protéines sériques. Les fractions rapides : pseudo-albumine, albumine, α_1 globuline ne subissent pas de modifications importantes ; par contre, il manque dans le sérum des nouveau-nés au moins trois α_2 globulines, deux β_1 globulines, les γ A et γ M globulines. Toutes ces lignes de précipitation apparaissent au troisième trimestre de la vie, de sorte que le spectre protéique d'un enfant d'un an diffère peu de celui d'un adulte.

Cette méthode permet d'apprécier en quelque sorte, rétrospectivement, la synthèse protéique à la fin de la vie embryonnaire.

On peut augmenter la sensibilité de l'analyse immuno-électrophorétique par l'autoradiographie (170). L'association de ces deux techniques est surtout utilisée pour l'étude de la fonction de transport des protéines plasmatiques.

L'immuno-électrophorèse trouve un vaste domaine d'application dans l'étude des protéines contenues dans les extraits d'organes (60) et les liquides de l'organisme tels l'urine (76), sperme (121), salive (59, 74), lait (190, 92), liquide céphalorachidien (201), lymphe. Ces liquides généralement très pauvres en protéines doivent être concentrés pour l'analyse immuno-électrophorétique ; cette opération de concentration paraît cependant inutile pour certains auteurs.

2°) *Etude des déterminants antigéniques.*

L'immuno-électrophorèse a acquis ces derniers temps une importance particulière en génétique et en médecine légale. A côté des groupes sanguins dont la classification se fonde sur certaines propriétés génétiques spécifiques des érythrocytes, on a découvert que certaines protéines sériques présentaient des phénomènes d'allotypie.

On désigne sous le nom de spécificités isotypiques les spécificités antigéniques uniformes pour chaque protéine chez tous les individus d'une même espèce. Ces spécificités isotypiques sont le critère de la grande hétérogénéité des protéines du sérum sanguin. A cette hétérogénéité est ajoutée une autre sorte d'hétérogénéité qui ne concerne que certaines protéines du sérum et qui a conduit à la notion d'allotypie.

Les spécificités allotypiques, qui sont à la base de cette deuxième sorte d'hétérogénéité, sont celles qui, pour une protéine caractérisée par sa spécificité isotypique, ne sont pas les mêmes chez tous les individus de la même espèce. On désigne sous le nom de motifs allotypiques et déterminants allotypiques les structures encore mal connues, qui sont le support matériel des spécificités allotypiques, et les éléments immunochimiquement distincts dont ces structures sont formées.

Les spécificités isotypiques et allotypiques reflètent des différences de structure primaire.

Au point de vue génétique, il y a correspondance entre une spécificité isotypique donnée, portée par une chaîne polypeptidique donnée des protéines, avec un locus déterminé ; et il y a correspondance entre les différentes spécificités allotypiques de la même chaîne peptidique et les allèles au même locus.

Un allotype est une catégorie de molécules défini par les spécificités isotypiques et allotypiques de ces molécules.

Nous noterons qu'il a été mis en évidence une troisième catégorie de spécificité extrêmement particulière, la spécificité idiotypique propre à chaque individu (163).

Chez l'homme l'existence de formes allotypiques est établie pour la transferrine (ou sidérophiline) (178), l'haptoglobine, la γ G globuline (groupe Gm), la Gc globuline, la β lipoprotéine (groupes Ag et Lp) (26, 171).

L'électrophorèse sur gel d'amidon ou de polyacrylamide est la méthode qui donne les meilleurs résultats lorsqu'il s'agit de différencier les groupes des haptoglobines (17). On peut toutefois faire aussi appel au test de diffusion en gélose et à l'immuno-électrophorèse pour la détermination de ces groupes (75, 86). L'interprétation a lieu après coloration de la benzidine en fonction de la position du tracé de l'haptoglobine par rapport à celui de l'hémopexine.

L'immuno-électrophorèse est, par contre, la meilleure technique pour la détermination des types de Gc globulines (87, 215). Les trois phénotypes (homozygotes 1-1, 2-2, et hétérozygote 2-1) sont identiques au point de vue immunologique mais différents quant à la

localisation des lignes d'immuno-précipitation correspondantes : leur vitesse de migration électrophorétique n'est pas la même. On a pu ainsi déterminer la fréquence des trois types dans une population.

3°) *L'analyse immuno-électrophorétique en biochimie.*

Les applications de l'immuno-électrophorèse dans l'étude des problèmes biochimiques sont fort nombreuses. Nous n'en citerons que quelques exemples. L'analyse immuno-électrophorétique permet d'étudier la fonction de transport des protéines, les phénomènes d'allotypie, les anomalies des protéines sériques et des humeurs de l'organisme humain et animal. Il est possible d'effectuer des immuno-électrophorèses des sérums de diverses espèces animales : Porc, Singe Rhesus, Cheval, Bœuf, Chèvre, Mouton (38), Chien, Chat, Souris (182), Rat (25), Hamster doré, Furet, Cobaye (79), Poule (207) à l'aide d'antisérums de lapin (8, 56, 223).

La spécificité et la sensibilité des réactions de précipitation permettent d'une part de distinguer des substances ayant des mobilités électrophorétiques identiques, d'autre part de mettre en évidence des constituants présents à très faible concentration.

Le nombre de constituants protéiniques d'un mélange peut être évalué sans traitement préalable. Ces constituants sont identifiés par leur mobilité électrophorétique, par leur spécificité immunochimique, parfois, par leur nature chimique ou autres propriétés, par exemple leur activité enzymatique.

1. — Détermination du nombre des constituants protéiniques.

La mise en évidence des constituants d'un mélange étant basée sur la réaction de précipitation spécifique, seuls les constituants capables de précipiter avec les anticorps sont susceptibles d'être décelés, donc des protéines.

L'analyse immuno-électrophorétique met en évidence des constituants qui ont la même mobilité électrophorétique, avantage par rapport à l'électrophorèse, et rend plus difficile la superposition ou la confluence des bandes de précipitation avantage sur l'immuno-diffusion en milieu gélifié.

Des arcs se superposent à condition que deux substances aient la même mobilité électrophorétique, que leur vitesse de diffusion soit identique, et que le rapport antigène-anticorps soit tel que les lignes de précipitation se forment au même endroit. Cette superposition peut être contrôlée en utilisant des proportions variées de réactifs et plusieurs immun-sérums.

Le nombre d'arcs indépendants permet le dénombrement des constituants d'un mélange. Ce nombre doit être considéré comme un minimum, car il est difficile d'affirmer que l'immun-sérum contient absolument tous les anticorps correspondants aux antigènes protéiniques du mélange (57, 68). L'immun-sérum est un produit biologique ; aussi pour pallier à cet inconvénient, il est nécessaire d'employer plusieurs sérums provenant d'animaux différents.

2. — Identification des constituants

L'identification d'un constituant d'un mélange par ses réactions spécifiques est particulièrement aisée lorsqu'on possède un échantillon pur.

Il existe plusieurs méthodes expérimentales pour identifier une ligne de précipitation donnée.

B) — EMPLOI D'ANTISÉRUMS SPÉCIFIQUES.

En pratiquant une rainure de chaque côté du sérum fractionné par électrophorèse, on est en mesure de contrôler par comparaison le sérum au moyen de deux antisérums différents. Si l'on emploie à cette fin un sérum précipitant le sérum humain et un sérum précipitant une protéine plasmatique déterminée (immun-sérum spécifique) l'emplacement de la ligne de précipitation du côté de l'antisérum spécifique indique, du fait qu'elle aboutit à un tracé de précipitation donné, du côté opposé, la position exacte de la ligne recherchée dans le tableau immuno-électrophorétique du sérum total.

B) — COLORATIONS SPÉCIFIQUES.

Certaines propriétés spécifiques qui persistent après l'immuno-précipitation, permettent de localiser certaines protéines plasmatiques dans le tableau immuno-électrophorétique : coloration des protéines (108), des lipoprotéines (208), de la céruloplasmine (93), de l'haptoglobine (107), des glycoprotéines (209).

C) — ADSORPTION SÉLECTIVE.

Si l'on dispose d'une protéine pure, on peut l'utiliser pour saturer un sérum précipitant le sérum humain jusqu'à l'adsorption complète de l'anticorps spécifique. Le tracé de cette protéine manquera alors dans le tableau immuno-électrophorétique. Pour l'adsorption sélective, on peut aussi employer des fractions de protéines plasmatiques, des sérums de malades atteints de pathoprotéinémies par carence, des sérums de nouveau-né, du lait, des urines concentrées.

D) — EMPLOI DE PROTÉINES PURES.

Le principe de ces techniques est basé sur l'emploi d'une substance pure en excès (100, 101). La technique de la « rainure interrompue » de CLAUSEN et HEREMANS (41) donne d'excellents résultats. Il en est de même pour le procédé dit « de la fente courte » de LÉVY et POLONOVSKI (128).

Ces méthodes expérimentales complètent l'identification simple d'après la position qu'occupe l'arc de précipitation. Cette position dans le sens de l'axe de migration dépend de la mobilité électrophorétique du constituant et permet la détermination de cette mobilité soit relative par rapport aux autres constituants, soit absolue.

E) — MISE EN ÉVIDENCE DES ENZYMES (211).

Les enzymes sont des molécules protéiniques ; elles sont antigéniques. Certaines ne perdent pas leur activité même après précipitation par les anticorps correspondants. De ce fait, si l'on place dans le gel contenant le précipité spécifique de l'enzyme un substrat caractéristique de cette même enzyme, il se forme autour de l'arc de précipitation des produits résultant de l'action de l'enzyme sur le substrat ; ces corps sont alors mis en évidence par des réactions appropriées.

L'analyse immuno-électrophorétique permet donc d'obtenir dans la même expérience des informations sur la structure et la fonction d'un constituant (212).

3. — Autres applications de l'analyse immuno-électrophorétique en biochimie

Il est possible d'effectuer une immuno-électrophorèse inversée (222), c'est-à-dire qu'on fait migrer l'immun-sérum et qu'on met ensuite l'antigène dans la fente ; on obtient ainsi des images qui montrent la répartition électrophorétique des anticorps. C'est ainsi qu'a été mise en évidence l'hétérogénéité des anti γ G.

e) Conclusion.

Dans les trente dernières années, on a effectué des études chimiques sur les protéines qui ont permis de révéler environ trente protéines dans le plasma de sujets humains normaux. Jusqu'à présent, on a pu en isoler vingt-six du sérum humain sous forme hautement purifiée et les soumettre à une étude physico-chimique. Ces protéines dont les caractéristiques sont bien connues représentent 96 p. 100 du total des protéines sériques. Les 4 p. 100 restant,

seraient surtout formés d'enzymes, de facteurs de coagulation et d'hormones protéiques.

L'analyse des diagrammes immuno-électrophorétiques ou immuno-phorégrammes n'est pas toujours très aisée. Le premier temps consiste à comparer les lignes de précipitation dans chaque zone électrophorétique et de comparer leur nombre et leur aspect à ceux donnés par un sérum de référence. Il faut donc étudier chaque ligne de précipitation individuellement sur l'immuno-phorégramme total : s'il s'agit d'une ligne de précipitation connue, des modifications de son aspect peuvent suggérer des variations quantitatives de la protéine ; d'autres fois, le problème est d'identifier une ligne de précipitation. Enfin, il est des problèmes particuliers tenant au caractère pathologique du sérum examiné. Il est nécessaire ensuite d'utiliser les antisérums spécifiques.

Le diagnostic immunologique clinique est encore à ses débuts. Toutefois, on peut prévoir que son application croissante et les connaissances qu'il nous permettra d'acquérir sur la composition protéinique du sérum et des différentes humeurs organiques dans les cas normaux comme dans les cas pathologiques, contribueront grandement au perfectionnement du diagnostic clinique en général.

II. — MATÉRIEL.

A. — Matériel.

Nous utilisons un équipement pour immuno-électrophorèse qui se compose du matériel suivant :

- petite table support munie d'un niveau à bulle,
- lames porte-objet pour microscope,
- cadres en polystyrène pouvant porter six lames,
- support cadre pouvant porter trois cadres superposés. Les cadres sont maintenus au moyen de deux crochets latéraux,
- emporte-pièce,
- couteau spécial gélose,
- chambre à électrophorèse : cuve type GRABAR,
- chambres en polystyrène pour la diffusion,
- micro-pipettes à striction PEDERSEN,
- bandes d'acétate de cellulose pour établir le contact entre la gélose et la solution-tampon,
- seringue et aiguilles pour couler la gélose sur les lames.

B. — Réactifs.

a) *Gélose.*

A partir de gélose purifiée et concentrée dite « gélose stock » se présentant sous forme de poudre, on prépare une solution-mère de gélose à 4 p. 100 :

Gélose stock	4 g
Eau distillée	100 ml
Merthiolate au 1/1000	quelques gouttes.

L'addition de merthiolate à la solution de gélose a pour but d'éviter la prolifération des microorganismes.

La solution de gélose se prépare au bain-marie bouillant jusqu'à dissolution complète de la poudre d'agar. Cette solution doit être parfaitement limpide et sans bulles. Préparée en général la veille de l'utilisation, cette solution-mère ne doit pas être conservée plus de huit jours à + 4° C.

b) *Solution-tampon.*

Tampon « Tris » 0,05 M, pH 8,8, force ionique 0,1, composé de barbiturate de sodium.

La solution-tampon doit être préparée extemporanément.

c) *Réactifs de coloration.*

— solution de coloration : Amido-Schwartz en solution saturée :

Amido-Schwartz — 10 (B)	1 g
Méthanol 70 p. 100	1.000 ml.

— solution de décoloration (et de fixation) :

Acide acétique	1 partie
Méthanol 70 p. 100	9 parties

d) *Antisérums.*

— Antisérums humains totaux ou multivalents de chèvre.

— Antisérums humains spécifiques de lapin ou de chèvre.

- Sérums anti- β_1A/β_1C globuline
- Sérums anti- γ A globuline
- Sérums anti- γ G globuline

e) *Sérum témoin, sérum de référence.*

Nous utilisons comme sérum témoin un pool de sérums normaux frais.

III. — MÉTHODE.

A) **Préparation des microplaques de gel d'agar.**

— solution de gélose à 2 p. 100 :

Solution-mère de gélose à 4 p. 100 100 ml

Solution-tampon pH 8,8 100 ml

Cette solution de gélose à 2 p. 100 ou solution de travail, obtenue par dissolution de la solution mère dans le tampon, doit être limpide et homogène.

Nous préparons la quantité de gélose nécessaire pour couvrir les lames pour une seule manipulation. Des réchauffements répétés altèrent le gel.

— Les lames porte-objets sont dégraissées à l'alcool-éther, puis séchées après immersion dans l'alcool ; elles sont alors disposées sur leur support.

— On dépose au moyen d'une seringue la solution de gélose à 2 p. 100 maintenue liquide au bain-marie bouillant, sur les lames porte-objets. Chaque lame placée sur un support horizontal est recouverte de 4 ml de gélose ; la répartition de la gélose doit être uniforme sur la surface de la lame. Les lames ainsi préparées sont conservées en atmosphère humide pour éviter la rétraction de la gélose.

— Les lames sont disposées sur les cadres-supports. Après dix minutes environ, temps nécessaire à la solidification complète de la gélose, on marque à l'aide d'un emporte-pièce, l'emplacement des godets et de la rainure centrale destinés à recevoir successivement les antigènes (sérum) et les anticorps (antisérum). L'emporte-pièce permet un découpage régulier : les deux godets doivent être à égale distance de la rainure pour établir une comparaison valable entre le sérum inconnu et le sérum normal témoin.

La distance entre les godets et la rainure centrale ne doit pas être trop faible : les antigènes diffuseraient trop vite.

— Avec la solution de gélose, nous remplissons les extrémités des cadres et nous réalisons des ponts entre les lames placées bout à bout, ceci afin d'assurer un passage uniforme du courant lors de l'électrophorèse.

— A l'aide d'une aiguille sans biseau, à pointe émoussée, on aspire la gélose des godets destinés à recevoir le sérum, c'est-à-dire l'antigène.

B) Mise en place de l'antigène.

Le mélange des antigènes à séparer par électrophorèse (sérum) est déposé dans les godets au moyen d'un tube effilé par capillarité : la quantité de sérum est d'environ un microlitre. Le godet doit être parfaitement rempli jusqu'au ras de la gélose sans bulle. Sur une même lame on dépose deux sérums : au-dessus de la rainure le sérum inconnu, en dessous, le sérum témoin.

C) Electrophorèse.

Les cadres portant les lames sont déposés sur les rampes de la chambre d'électrophorèse.

On place une bandelette d'acétate de cellulose saturée de solution-tampon à chaque extrémité du cadre et sur les ponts de gélose.

L'électrophorèse est effectuée sous tension constante de 350 volts, durant environ 2 heures.

D) Mise en place de l'antisérum.

L'électrophorèse terminée, après l'arrêt du courant, on enlève les bandelettes d'acétate de cellulose servant de ponts.

On découpe ensuite la rainure destinée à recevoir l'antisérum. On remplit la rainure de 40 microlitres d'antisérum à l'aide d'une micropipette à striction.

Les plaques de gélose ainsi préparées sont placées en chambre humide pour éviter la dessiccation pendant la diffusion.

La majorité des précipitations spécifiques est plus rapide mais moins complète à 37° C qu'à 0° C. Nous utilisons une température intermédiaire : 20° C.

Pour la plupart des protéines, la précipitation des corps d'immunisation, s'effectue au bout de 24 heures, mais un temps de 40 heures est nécessaire ; les macroglobulines diffusant lentement.

E) Fixation de l'image. Expression des résultats.

Vus par transparence sous forme de traits fins et blanchâtres, les immuno-précipités sont colorés après séchage et lavage de la lame de gélose.

1) Dans un premier temps, *on remplit les godets et la rainure centrale* au moyen de la solution de gélose à 2 p. 100 pour empêcher l'éclatement pendant le séchage.

2) *Lavage des lames.* On laisse les lames pendant une heure dans une solution d'eau physiologique, puis trois heures sous courant d'eau ordinaire. Le débit de l'eau doit être suffisant pour assurer un brassage continu de l'eau.

— Cette opération a pour but d'éliminer toutes les protéines qui n'ont pas participé à la réaction spécifique.

3) *Séchage des lames.* On expose les lames recouvertes d'un papier filtre à la ventilation durant trois heures.

4) *Coloration.* Elle facilite l'identification des arcs de précipitation en les visualisant beaucoup plus nettement.

a) on plonge les lames dans la solution d'Amido-Schwartz pendant 45 minutes ;

b) on place les lames immédiatement après dans deux bains de décoloration, pour décolorer le fond de la lame. Les lames sont séchées à l'air libre.

5) *Expression des résultats.* Un agrandissement sur papier photographique est effectué sur chaque lame.

B) METHODES DE DOSAGE DES PROTEINES PLASMATIQUES PAR IMMUNO-DIFFUSION — METHODE DE MANCINI

I. — PRINCIPE.

L'analyse immuno-électrophorétique ne permet de déceler qu'une augmentation ou une diminution des protéines plasmatiques ; le chevauchement des arcs de précipitation de l'immunophorégramme rend tout enregistrement impossible. Un dosage quantitatif devient un complément nécessaire. Aussi la réaction de précipitation antigène-anticorps a été rapidement utilisée pour la détermination quantitative.

1) Si l'on emploie pour le dosage *la double diffusion* selon OUCHTERLONY (157) il faut tenir compte de la distance réciproque des deux tracés (51). En utilisant des antisérums spécifiques, on peut ainsi déterminer avec une précision suffisante de petites quantités de protéines étrangères dans les précipitations de protéines isolées. La double diffusion se prête également à la détermination semi-quantitative des protéines existant dans le sérum à l'état de

traces à cause de la faible dépense en antisérum. Cette diffusion est effectuée selon une macrotechnique (méthode d'OUCHTERLONY) ou une microtechnique (méthode de HARTMANN) (44).

2) Il est possible en appliquant *les principes d'HEIDELBERG et KENDALL* (82) de précipiter en milieu liquide, la protéine, prise comme antigène, à l'aide de l'anticorps correspondant et de déterminer la teneur en azote de ces immuno-précipités isolés. Les travaux d'AMBROSIUS (9, 10) ont permis d'augmenter la sensibilité de la détermination. Par spectrométrie on peut déterminer les immuno-précipités provenant d'un microgramme de protéines, après coloration à l'Amido-Schwartz. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité du précipité.

L'appréciation du précipité par turbidimétrie (185) ou par micro-turbidimétrie (94) permet une simplification de la détermination. Ces mesures néphélométriques des réactions antigène-anticorps présentent un intérêt particulier, mais exigent certaines conditions pour obtenir des résultats exacts. Il faut en effet, tenir compte de la teneur en lipoïdes et en glucides des protéines et apporter des corrections si les sérums sont troubles ou contiennent de l'hémoglobine.

3) D'autres techniques combinant l'électrophorèse et la diffusion ne donnent que des résultats semi-quantitatifs, telle *la méthode d'AFONSO* (1, 2, 3) et *BEDNARIK* (23) qui consiste en une détermination des différentes protéines sériques par gradient de diffusion. Le gradient de diffusion de l'antisérum est éliminé en l'incorporant uniformément dans toute la surface de la gélose après l'électrophorèse. Les diamètres transverses des taux de précipitation de la solution protéique standard permettent d'obtenir une courbe-étalon à partir de laquelle on pourra lire les concentrations inconnues des protéines sériques.

4) *Une méthode de diffusion en tubes* permet la détermination des protéines au moyen d'antisérums spécifiques. La mise au point de cette technique de dosage par immuno-diffusion, est due à *ODIN* (159). Cette méthode de diffusion linéaire en tube, utilisée par *HITZIG* (90, 91) principalement, est basée sur le principe suivant : on introduit dans des tubes de gélose contenant de l'antisérum humain une dilution de sérum à analyser, correspondant volume à volume à la préparation de référence. Les dilutions du sérum inconnu sont telles que leur teneur en protéines soit comprise dans les limites de la zone couverte par les précipitations obtenues avec le sérum de référence. Après vingt-quatre heures de repos, le gel présente une zone trouble due à la précipitation antigène-anticorps. Dans les limites des concentrations utilisables, la hauteur de cette couche trouble, est proportionnelle au carré de la concentration en antigène.

5) *Selon une méthode décrite par LAURELL (117, 118, 119, 120)*, les protéines peuvent être dosées par électrophorèse dans un gel d'agarose, contenant de l'antisérum.

Cette méthode combine la migration électrophorétique d'un mélange de protéines à pH 8,6, dans un gel d'agarose et la formation d'un complexe insoluble entre une protéine donnée et l'anticorps correspondant à l'aide d'un antisérum spécifique incorporé au gel. La réaction entre l'anticorps et la protéine à doser se traduit sur la plaque par un pic de précipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de cette protéine. La diffusion de la protéine se fait dans une direction perpendiculaire à celle de l'électrophorèse. La vitesse de diffusion des protéines dans le gel contenant les anticorps est augmentée sous l'influence du champ électrique.

Cette technique, la plus rapide de toutes les méthodes quantitatives immuno-chimiques, nécessite cependant un étalonnage avec des protéines purifiées, ce qui limite actuellement son application.

Des auteurs CLARK et FREEMAN (39) ont essayé par cette méthode de déterminer quantitativement les protéines d'un sérum entier. Cet objectif a été provisoirement abandonné car le dosage n'est valable que si l'antigène et l'anticorps ont une mobilité électrophorétique suffisamment différente. Aussi la méthode de LAURELL n'est-elle utilisée que pour la détermination de quelques protéines sériques (145).

6) *Méthodes par immunodiffusion radiale*. D'autres méthodes utilisent des plaques de gélose et permettent le dosage des protéines par une réaction d'immunoprécipitation dans un gel d'agar contenant des anticorps.

Basée sur ce principe, nous pouvons citer :

- la méthode de FEINBERG (55),
- la méthode de HAYWARD et AUGUSTIN (80),
- la méthode de MANCINI (131).

La méthode de MANCINI, CARBONARA et HEREMANS (132, 54) correspond à une immunodiffusion radiale et simple. Un des composants du système antigène-anticorps, l'anticorps en général, est incorporé dans un gel d'agar de façon homogène. L'antigène correspondant, est déposé dans des godets ménagés dans la gélose contenant de l'anticorps. Après le temps nécessaire à la diffusion, il se forme autour du godet, un anneau de précipitation, dont la surface est proportionnelle à la quantité d'antigène.

Cette méthode bien que moins rapide que celle de LAURELL est aussi sensible (22, 211). C'est aussi la plus utilisée actuellement pour la détermination quantitative des protéines sériques.

Chacune des grandes fractions électrophorétiques des globulines est un mélange en nombre élevé de composants dont chacun possède une signification physiopathologique individuelle. Certaines fractions existant normalement à l'état de traces, augmentent notablement de façon constante dans des états pathologiques définis ; cette augmentation, comme nous l'avons vu, peut être décelée par immuno-électrophorèse, mais il est souvent nécessaire de la déterminer avec précision, car elle dépend du stade de la maladie. De plus, suivre l'évolution du taux de la protéine permet de suivre celle de la maladie et particulièrement de voir s'il y a rémission au cours du traitement.

Plusieurs auteurs, utilisant des méthodes immunochimiques, ont déterminé la teneur exacte de plus de vingt protéines du sérum dans différentes conditions physiologiques (adulte, femme enceinte, vieillards).

Au point de vue pathologique, on constate des anomalies portant sur les protéines sériques au cours des maladies hépatiques, rénales, infectieuses, dans les patho-protéïnémies congénitales, dans la phase aiguë des processus inflammatoires, dans les diverses formes de syndrome de carence en anticorps.

Les taux normaux peuvent varier d'une technique à l'autre, d'où l'importance lorsqu'on transmet un résultat d'indiquer non seulement la méthode utilisée, mais encore les taux normaux obtenus par cette technique.

II. — MATÉRIEL.

1. — Matériel.

Les plaques d'immuno-diffusion servent au dosage spécifique de diverses protéines dans le sérum de sujets sains ou malades. Chacune des plaques données, imprégnée d'un immun-sérum, sert au dosage de la protéine correspondante.

a) PLAQUES DE GEL D'AGAR.

α) Préparation des plaques de gel d'agar.

On prépare une solution de gel d'agar à 2 p. 100, en dissolvant au bain-marie bouillant la quantité d'agar voulue dans le tampon de Michaelis de pH 8,6 en lui ajoutant 0,1 p. 100 de thiocide comme agent de conservation. On laisse refroidir, à 50° C au bain-marie, la solution d'agar. On mélange soigneusement à cette solution maintenue à 50° C l'antisérum préalablement chauffé à 48° C. Suivant la nature et la teneur en anticorps de l'antisérum, on mélange 5 à 15 p. 100 d'antisérum par rapport au mélange final d'agar-antisérum.

On dépose avec une pipette une quantité exacte de ce mélange dans des boîtes de Pétri ou des plaques en polystyrène, dont le fond est rigoureusement plat : l'agar se solidifie en formant une couche d'environ 1,5 mm d'épaisseur.

Dans la couche d'agar au moyen d'une aiguille à injection à pointe émoussée, on perce des godets de dimension rigoureusement identique (2 mm de diamètre).

On peut conserver les plaques de gélose en leur état final, munies d'un couvercle dans une chambre humide à 4° C.

β) *Les sources d'erreurs.*

— L'antisérum ne doit pas être chauffé à plus de 50° C sinon les anticorps sont inactivés.

— La couche de gélose doit être d'épaisseur uniforme.

— Les plaques à immuno-diffusion doivent être conservées avant usage au réfrigérateur à une température d'environ 4° C ; il faut éviter dans tous les cas de les porter à une température au-dessous du point de congélation.

b) PIPETTES CAPILLAIRES.

— Des pipettes capillaires sont prévues pour le remplissage des godets de la plaque d'immuno-diffusion.

2. — Réactifs.

Solutions de protéine purifiée et dosée : 3 concentrations différentes permettent l'étalonnage.

De l'azide de sodium à raison de 0,1 p. 100 est ajouté comme agent bactéricide.

Les solutions conservées entre 2 et 8° C sont stables durant un an.

Il faut s'assurer que l'antigène protéinique utilisé comme référence ne forme pas d'agréats de molécules, sinon les conditions d'une évaluation correcte ne sont plus assurées.

III. — MÉTHODE.

1) *Mode opératoire.*

a) On remplit un des trous avec l'échantillon en appliquant la pointe de la pipette capillaire au fond du godet. On laisse couler la solution par gravité jusqu'à ce que le niveau atteigne la surface du gel.

b) On remplit de la même manière, successivement trois godets au moyen des trois solutions servant à l'étalonnage. Diverses conditions influençant la diffusion, il est nécessaire de refaire une courbe d'étalonnage. Pour chacune des séries, au moins un étalon devra être inclus comme contrôle dans chaque plaque.

c) On laisse diffuser en chambre humide :

Plaques pour dosage de	Température	Durée (heures)
β_1A/β_1C globuline	20 à 25° C	16 à 48
γ A globuline	20 à 25° C	16
γ G globuline	37 à 40° C	4

2) Expression des résultats.

a) Après le temps nécessaire, on mesure le diamètre de chaque cercle de précipitation.

b) Sur du papier semi-logarithmique, on porte en ordonnée les concentrations des solutions protéiques d'étalonnage en mg/l et en abscisse les diamètres mesurés en mm.

c) On détermine la concentration de la protéine dans l'échantillon inconnu par interpolation, en se référant à la courbe d'étalonnage, son diamètre de diffusion étant connu.

En effet, la diffusion peut s'exprimer par l'équation :

$$d = e^{-Kc}$$

où :

d = diamètre de diffusion

c = concentration en antigène

K = constante si on opère dans les mêmes conditions de température et de concentration en anticorps pendant un temps déterminé.

soit par transformation

$$\text{Log } C = Kd + d_0$$

où d_0 = diamètre du godet.

3) Remarques techniques.

a) Les godets doivent être remplis au même niveau et sans bulle.

b) Le maximum de précision est obtenu quand le taux de la protéine à doser est compris entre les concentrations des étalons.

Si le taux dépasse la valeur de référence la plus élevée, on dilue le sérum inconnu dans une solution physiologique (solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1000) afin de réduire le taux des protéines.

C) DOSAGE DE LA COMPLEMENTEMIE

a) Dosage du complément total C (77-31)

I. — PRINCIPE.

A une quantité constante d'un mélange : hématies de mouton-sérum de lapin anti-hématies de mouton (système hémolytique) sont ajoutées des doses croissantes du sérum à doser. Les degrés d'hémolyse obtenus sont appréciés au photocolorimètre. La courbe établie d'après ces différentes valeurs (densités optiques lues par rapport aux doses de sérum) permet la détermination de la quantité de sérum qui provoque l'hémolyse de 50 p. 100 des hématies utilisées et représente de ce fait une unité de complément CH 50. Le nombre d'unités contenues dans 1 ml du sérum exprime son activité complémentaire.

II. — MATÉRIEL.

1) Matériel.

Le matériel commun aux dosages du complément et de la fraction C_3 comprend :

- bain-marie à 37° C
- bain d'eau glacée, entre 0° et 4° C
- centrifugeuse
- photocolorimètre (525 m μ).

2) Réactifs.

Les réactifs nécessaires à ce dosage servent également pour le dosage de C_3 . La préparation des réactifs ainsi que toutes les manipulations, sont réalisées en bain d'eau glacée.

— TAMPON DE MAYER (Institut Pasteur).

Ce tampon, utilisé pour les différentes suspensions et dilutions, est un tampon véronal à pH 7,4 contenant des ions Calcium (Ca^{++}) et Magnésium (Mg^{++}).

Cette solution est diluée au 1/5 au moment de l'emploi.

— LES HÉMATIES DE MOUTON proviennent de l'Institut Pasteur et sont lavées 4 fois en tampon véronal (le surnageant doit être limpide et clair), puis mises en suspension à 1 p. 100 dans ce même tampon. La concentration globulaire est *ajustée* par la mesure de l'hémolyse totale au photocolorimètre 525 m μ . Un ml de cette suspension, hémolysé par 3 ml d'eau distillée, doit avoir une densité optique égale à 0,50.

— LE SÉRUM HÉMOLYTIQUE DE LAPIN ANTI-HÉMATIES DE MOUTON, décomplémenté par chauffage à 56° C pendant 30 minutes, est dilué à 0,5 p. 100 en tampon véronal.

— MÉLANGE HÉMOLYTIQUE.

Il est réalisé par mélange à *parties égales* de la suspension d'hématies à 1 p. 100 et du sérum hémolytique décomplémenté et dilué. Ce mélange est incubé 15 minutes à 37° C. Il doit être utilisé pendant les heures qui suivent sa préparation et conservé à une température de 0° à 4° C.

III. — MÉTHODE.

1) Contrôle des réactifs effectués pour chaque série de dosage.

* CONTRÔLE DE L'ABSENCE D'HÉMOLYSE SPONTANÉE DU MÉLANGE HÉMOLYTIQUE.

1 ml du mélange hémolytique et 2 ml de tampon véronal sont mis à incuber 1 heure à 37° C. Après centrifugation 10 minutes à 4.000 tr/mn et addition de 1 ml d'eau distillée au surnageant, la densité optique doit être voisine de zéro. Ce tube de contrôle est utilisé pour régler le zéro de l'échelle de lecture du photocolorimètre, lors de la détermination des hémolyses.

* CONTRÔLE DE L'HÉMOLYSE.

La vérification des densités optiques obtenues par l'hémolyse 100 p. 100 et l'hémolyse 50 p. 100 des hématies de ce mélange est réalisée de la façon suivante :

Hémolyse	100 p. 100	50 p. 100
Mélange hémolytique	1 ml	0,5 ml
Eau distillée	3 ml	3,5 ml
Densités optiques	0,250	0,125

2) Préparation du sérum à doser.

— Le sérum à doser est séparé après coagulation du sang total prélevé par ponction veineuse. Il doit être utilisé frais, le jour même, ou conservé 24 heures au maximum à 4° C.

— Faire une absorption systématique de l'hémolyse naturelle qui peut éventuellement exister dans le sérum humain et qui hémolyse les hématies de mouton.

Ajouter à 1 ml de sérum + 0,3 ml d'hématies de mouton à 1 p. 100.

Après un contact de 15 minutes à 4° C, une centrifugation rapide permet de récupérer le *sérum absorbé*.

— Diluer le sérum absorbé au 1/10 en tampon véronal.

3) Mode opératoire. Réactions d'hémolyse.

Préparer une série de tubes et opérer suivant le tableau ci-dessous :

Réactifs	Volumes exprimés en ml					
Sérum au 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40
Tampon véronal	1,95	1,90	1,85	1,80	1,70	1,60
Mélange hémolytique	1	1	1	1	1	1

Après incubation de une heure au bain-marie à 37° C, les tubes sont refroidis au bain d'eau glacée et centrifugés. Le surnageant dans sa totalité, est additionné de un ml d'eau distillée, et la densité optique est mesurée au photolorimètre à 525 mμ.

4) Expression des résultats.

La lecture de différentes hémolyses obtenues permet d'établir une courbe des densités optiques en fonction des doses de sérums utilisées.

Le point où la courbe d'hémolyse tracée pour chacun des sérums coupe la ligne d'hémolyse 50 p. 100 indique la quantité de ce sérum nécessaire à la lyse de 50 p. 100 des hématies du système utilisé, c'est-à-dire la quantité de sérum qui contient une unité de complément CH 50.

D'après les coordonnées de la courbe établie, soit x ml du sérum étudié dilué au 1/10 qui provoque l'hémolyse 50 p. 100. Ce sérum contient donc par ml :

$$\frac{1 \times 10}{x} = n \text{ unités CH 50/ml}$$

— résultats (77) :

Chez un homme adulte sain, le chiffre moyen est :

100 ± 26 Unités CH 50/ml.

b) Dosage de la troisième fraction du complément : C_3

I. — PRINCIPE.

Selon HEGEDUS et GREINER (81), l'activité du complément est limitée par celle du plus faible constituant du complément. Le dosage de chacun de ceux-ci revient donc à une estimation de l'activité totale du complément à condition que les autres fractions soient artificiellement augmentées. Cela est réalisé par l'emploi de réactifs privés de l'une des fractions (28).

II. — MATÉRIEL.

1) *Matériel identique au dosage de C_3 .*

2) *Réactifs.*

α) **PRODUITS NÉCESSAIRES A LA PRÉPARATION DU RÉACTIF « R_3 » :**

- sérums humains frais
 - solution de chlorure de sodium 0,15 M
 - suspension de zymosan contenant 50 mg/ml
- | | |
|-------------------|-------|
| zymosan | 0,1 g |
| NaCl 0,15 M | 2 ml |

Cette suspension est portée 1 heure à 100° C.

Refroidir dans un bain d'eau glacée. Centrifuger.

Laver le culot par NaCl 0,15 M bouillant. Centrifuger.

Culot	totalité
NaCl 0,15 M	2 ml

Cette suspension contient 50 mg de zymosan par ml.

Remarque : cette suspension doit être préparée extemporanément.

β) **RÉACTIFS UTILISÉS POUR LE DOSAGE DU COMPLÉMENT TOTAL.**

III. — MÉTHODE.

1) *Préparation de « R_3 ».*

La méthode choisie pour la préparation du réactif est celle d'HEGEBUS et GREINER adaptée par PONDNAM (168). Un sérum frais est

soumis à différents traitements qui inactivent la troisième fraction du complément. On utilise un mélange de plusieurs sérums humains normaux frais.

Le troisième composant du complément est inactivé par le zymosan.

Sérum	5 ml
Suspension de zymosan	0,2 ml
Tampon véronal	4,8 ml

Après incubation de 1 heure à 37° C la réaction est arrêtée par refroidissement à 4° C. Une centrifugation permet de séparer R₃ qui doit être conservé à — 20° C.

2) Contrôle du réactif « R₃ ».

« R₃ » ne doit plus avoir d'activité hémolytique à la dose utilisée.

R ₃	0,15 ml
Tampon véronal	1,85 ml
Mélange hémolytique	1 ml

Terminer comme pour le dosage du complément total. Il ne doit plus y avoir d'activité hémolytique : c'est-à-dire que l'adsorption doit être nulle.

3) Mode opératoire.

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum absorbé au 1/20 (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30
R ₃ (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Tampon (ml)	1,80	1,75	1,70	1,65	1,55
Mélange hémolytique (ml)	1	1	1	1	1

Après incubation 1 heure à 37° C, le dosage est terminé comme celui du complément total.

4) Expression des résultats.

La valeur x' obtenue représente l'activité du complexe C_{1q, 4, 2a}, soit x CH 50 le taux du complément total.

La valeur de C₃ = x' — x

Chez un sujet adulte normal, la valeur de C_3 appréciée par cette technique est de 85 ± 36 CH 50/ml (219).

D) METHODES STATISTIQUES UTILISEES

Dans ce travail ont été envisagés :

- le calcul des moyennes arithmétiques et des écarts 2σ ;
- le calcul des corrélations entre les concentrations des fractions sériques prises deux par deux ;
- la comparaison de deux moyennes.

1) Moyenne et écart 2σ

On peut évaluer, à partir d'un échantillon X d'effectif n , la moyenne et la variance de la population.

Pour la moyenne m , on calcule la moyenne arithmétique des valeurs x observées :

$$m = \frac{\sum x}{n}$$

La variance s^2 est donnée par la formule

$$s^2 = \frac{\sum (x - m)^2}{(n - 1)}$$

où : $(n - 1)$ représente le nombre de degrés de liberté (d.d.l.) ;
 Σ = somme de

L'écart σ correspond à la probabilité pour qu'il y ait 65 p. 100 des valeurs x qui se trouvent dans l'intervalle $(m - \sigma, m + \sigma)$;

L'écart 2σ correspond à la probabilité pour que 95 p. 100 des valeurs x se situent dans l'intervalle $(m - 2 \sigma, m + 2 \sigma)$

$$\sigma = \sqrt{s^2}$$

2) Corrélation.

L'étude des corrélations permet d'étudier l'existence d'une liaison entre deux caractères quantitatifs. Les deux variables ont un rôle symétrique si le coefficient de corrélation « r » est significativement différent de zéro.

« r » exprime l'intensité de la corrélation : l'association est d'autant plus étroite que « r » est voisin de 1. Si « r » est positif, aux

fortes valeurs de l'une des variables sont associées les fortes valeurs de l'autre ; si « r » est négatif, aux faibles valeurs de l'une sont associées les fortes valeurs de l'autre.

Si on compare deux variables X et Y dont les valeurs moyennes sont respectivement $\bar{x}$ et $\bar{y}$, « r » répond à la formule :

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

$$\begin{aligned} \text{où : } x_i &= x - \bar{x} \\ y_i &= y - \bar{y} \end{aligned}$$

La table de corrélation indique, en fonction du d.d.l., la probabilité α extérieure à l'intervalle ($-r$, $+r$).

« r », positif ou négatif, est significativement différent de zéro pour α égal ou inférieur à 5 p. 100.

3) Comparaison de deux moyennes.

La comparaison de deux moyennes mA et mB observées sur deux échantillons A et B d'effectif $n_A < 30$ et $n_B < 30$ est fondée sur la valeur de :

$$t = \frac{mA - mB}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}}$$

où s^2 désigne l'estimation de la variance, supposée commune, par la formule :

$$s^2 = \frac{\sum (x_A - mA)^2 + \sum (x_B - mB)^2}{n_A + n_B - 2}$$

où : x_A sont les valeurs observées pour le groupe A ;

x_B celles de B ;

$n_A + n_B - 2$ représente le degré de liberté ou d.d.l.

Si « t » est inférieur à la valeur lue dans la table de « t » pour le d.d.l. et le risque α inférieur à 5 p. 100, la différence n'est pas significative ; dans le cas contraire elle est significative et le risque α indiqué par la table pour la valeur de « t » trouvée fixe le degré de signification.

Le test n'est utilisable que si le caractère étudié est distribué selon des lois normales de même variance dans les deux populations A et B.

E) ECHANTILLONS OBJETS DE L'ETUDE

Les différentes techniques exposées ont été appliquées à l'étude de sérums frais provenant de sang humain obtenu par ponction veineuse au pli du coude, sauf en ce qui concerne l'étude des sérums à la naissance qui a été effectuée sur le sang du cordon ombilical.

Dans tous les cas, les analyses ont été réalisées le jour même du prélèvement, ou après conservation à 4° C 24 heures au maximum.

Les patients sur lesquels ont porté ces études font partie d'une population hospitalière hétérogène quant à l'âge, le sexe et l'état pathologique.

Nous avons groupé les sujets étudiés en fonction de l'âge qui est un des facteurs bien connus entraînant des variations du complément, de la β_1A/β_1C globuline et des immunoglobulines. Le plus souvent, les diagnostics étaient établis et nous les avons inscrits sur les tableaux annexes.

Dans ce travail, nous n'avons fait qu'aborder l'étude de quelques groupes pathologiques à titre d'exemples d'application de ces techniques d'étude.

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A) ETUDE DE L'ACTION DE FACTEURS PHYSICOCHEMQUES SUR LA β_1A/β_1C GLOBULINE

L'étude des facteurs physicochimiques agissant sur la transformation de la β_1C en β_1A globuline a été effectuée sur des sérums humains pris au hasard.

Pour l'étude de l'action du vieillissement sur la β_1A/β_1C globuline, les sérums ont été conservés en ampoules stériles scellées.

L'étude de chaque facteur a été effectuée par I.E. et dosage par immuno-diffusion radiale de la β_1A/β_1C globuline pour dix sérums différents.

I. — ÉTUDE ANALYTIQUE.

1) Inhibition du complément.

Lorsqu'on décomplémente le sérum par chauffage à 56° C pendant 30 minutes, on observe une précipitation protéique au niveau du godet d'ensemencement témoignant d'une dénaturation partielle de certaines protéines. Cette dénaturation due au chauffage porte également sur la β_1A/β_1C globuline comme l'indique la diminution de l'arc de précipitation sur les clichés d'I.E. (figure 1). La β_1C sérique semble plus stable.

La diminution du taux de la β_1A/β_1C globuline est confirmée par le dosage de cette protéine par immuno-diffusion radiale (tableau I, p. 84).

Les valeurs moyennes de la β_1A/β_1C sont :

— pour 10 sérums frais de 1680 ± 440 mg/l

— pour ces 10 sérums décomplémentés de $790 + 400$ mg/l.

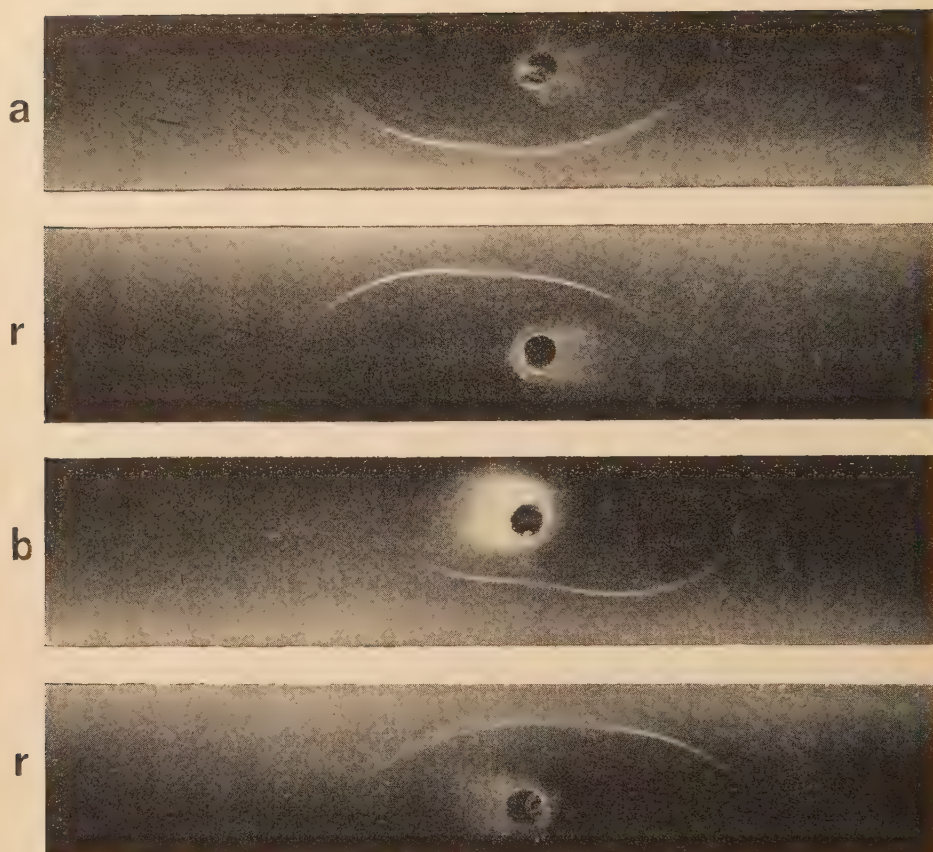


Figure 1 : Etude de la β_1A/β_1C globuline par I.E. après inhibition du complément total par chauffage à 56° C pendant 30 minutes, contre un antisérum spécifique anti β_1A/β_1C .

a = sérum frais
b = sérum (a) décomplémenté
r = sérum de référence

Figure 2 : Etude de la β_1A/β_1C globuline d'un sérum individuel par I.E. action du zymosan et de R_3 contre un antisérum spécifique β_1A/β_1C .

a = sérum frais
b = sérum (a) incubé 1 H. à 37° C
c = sérum (a) incubé 1 H. à 37° C + zymosan
d = sérum (a) incubé 1 H. à 37° C + R_3

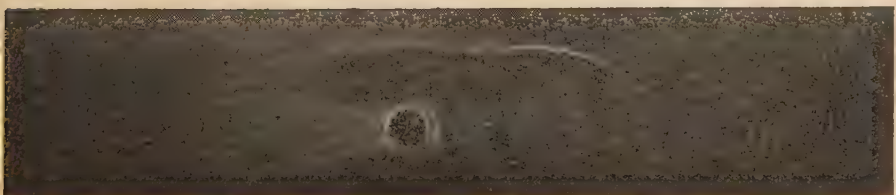
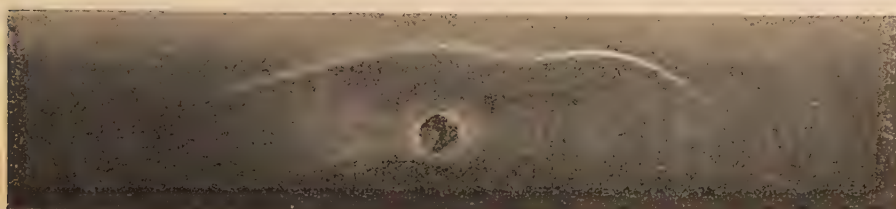


TABLEAU I

Taux de la β_1A/β_1C globuline avant et après inhibition du complément sérique par chauffage à 56° pendant 30 minutes.

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)	
	Sérum frais	Sérum décomplémenté
1	2900	790
2	1900	790
3	1900	1200
4	1900	1200
5	1900	790
6	1900	800
7	800	330
8	1200	500
9	1900	1200
10	500	330

2) Action du zymosan et du réactif R_3 .

L'action du zymosan ou du réactif « R_3 » qui inhibe C_3 n'entraîne aucune variation quantitative de la β_1A/β_1C globuline (tableau II).

Les moyennes et les écarts 2σ sont :

- pour 10 sérums frais 1510 $\pm$ 240 mg/l
- pour ces 10 sérums incubés 1 H. à 37° C 1490 $\pm$ 240 mg/l
- pour ces 10 sérums incubés 1 H. à 37° C
en présence de zymosan 1500 $\pm$ 240 mg/l
- pour ces 10 sérums incubés 1 H. à 37° C
en présence de « R_3 » 1460 $\pm$ 260 mg/l

Sur les clichés d'I.E. de la figure 2, on n'observe effectivement aucune modification importante des arcs de précipitation β_1A et β_1C . Tout au plus, l'action du zymosan se traduit par une légère diminution de la fraction β_1C (figure 2 d).

TABLEAU II

Taux de la β_1A/β_1C globuline série après action du zymosan
et de R_3

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)			
	Sérum frais	Sérum incubé 1 H. à 37° C	Sérum incubé 1 H. à 37° C + Zymozan	Sérum incubé 1 H. à 37° C + R_3
1	1200	1200	1200	1200
2	1350	1350	1350	1100
3	1350	1350	1350	1350
4	1850	1850	1850	1850
5	1350	1350	1350	1200
6	1350	1350	1350	1350
7	1850	1850	1850	1850
8	1200	1000	1350	1100
9	2400	2400	2200	2400
10	1200	1200	1350	1100

3) Action du vieillissement du sérum en fonction de la température.

a) *Conservation du sérum à — 20° C pendant une semaine.*

Les fractions β_1A et β_1C restent dans les mêmes proportions d'après les clichés d'I.E. (figure 3) et le taux global de la β_1A/β_1C globuline reste inchangé (tableau III, p. 88).

Les valeurs moyennes de la β_1A/β_1C et les écarts obtenus par immuno-diffusion radiale sont :

— pour 10 sérums frais 1300 $\pm$ 240 mg/l
— pour ces 10 sérums congelés pendant 1 semaine 1320 $\pm$ 230 mg/l

b) *Conservation du sérum à + 4° C pendant une semaine.*

Le cliché d'I.E. (figure 4) montre une diminution très nette de la fraction β_1C et une augmentation de la β_1A . Il s'agit bien d'une transformation quantitative de la β_1C en β_1A comme le montre le tableau IV (p. 88) concernant les taux de la β_1A/β_1C globuline.

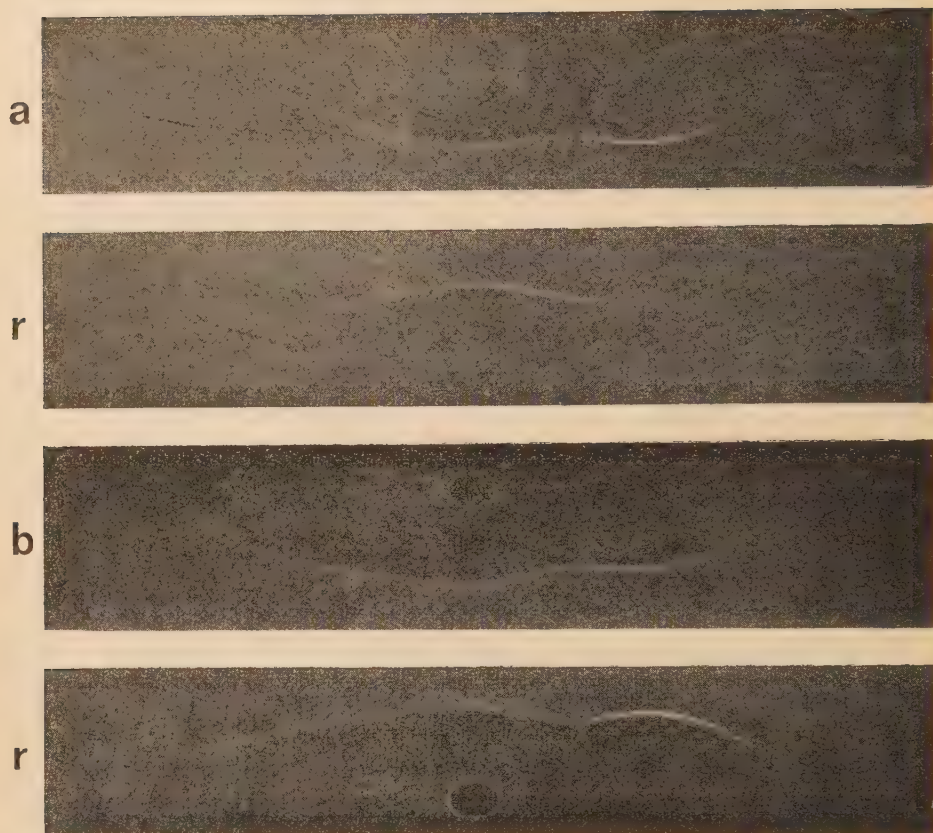


Figure 3 : Etude de la β_1A/β_1C globuline d'un sérum individuel par I.E. après conservation du sérum une semaine à -20°C contre un antisérum spécifique anti β_1A/β_1C .

a = sérum frais

b = sérum (a) conservé 1 semaine à -20°C

r = sérum de référence

Figure 4 : Figure de la β_1A/β_1C globuline d'un sérum individuel par I.E. conservation du sérum une semaine à $+4^\circ \text{C}$ et à $+37^\circ \text{C}$ un antisérum spécifique anti β_1A/β_1C .

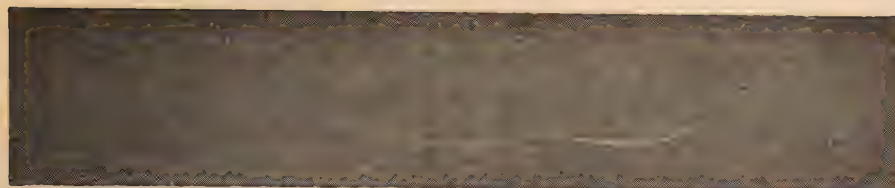
a = sérum frais

b = sérum (a) conservé 1 semaine à $+4^\circ \text{C}$

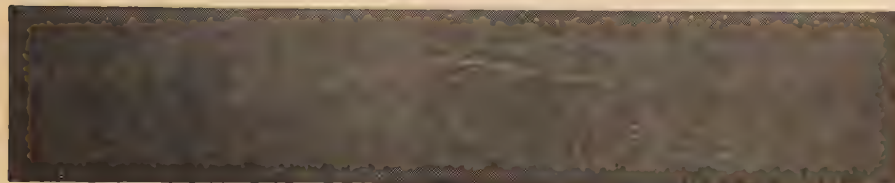
c = sérum (a) conservé 1 semaine à $+37^\circ \text{C}$

r = sérum de référence

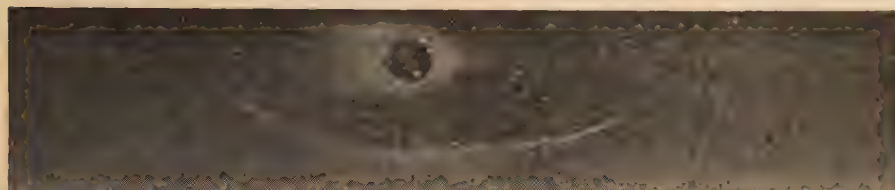
a



r



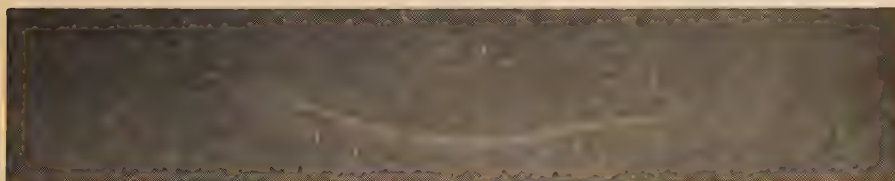
b



r



c



r

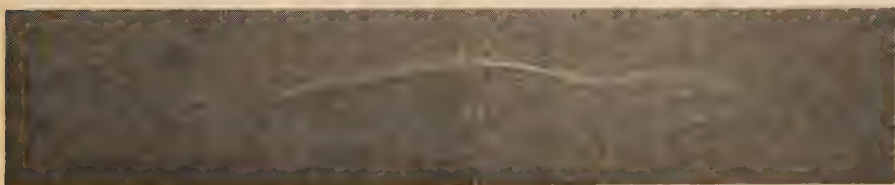


TABLEAU III

Taux de la β_1A/β_1C globuline après conservation
du sérum à -20°C pendant une semaine.

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)	
	Sérum frais	Sérum conservé à -20°C 1 semaine
1	1200	1300
2	1850	1850
3	1450	1450
4	450	500
5	1200	1200
6	1850	1850
7	1300	1300
8	1200	1200
9	1300	1300
10	1200	1200

TABLEAU IV

Taux de la β_1A/β_1C globuline après conservation
du sérum une semaine à $+4^\circ\text{C}$.

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)	
	Sérum frais	Sérum conservé à $+4^\circ\text{C}$ 1 semaine
1	1200	1200
2	1350	1350
3	1350	1350
4	1850	1850
5	1350	1350
6	1350	1350
7	1850	1850
8	1200	1200
9	2400	2400
10	1200	1350

Les taux moyens et les écarts 2σ sont :

— pour 10 sérums frais	1510 $\pm$ 250 mg/l
— pour ces 10 sérums conservés 1 semaine à + 4° C	1520 $\pm$ 250 mg/l

c) *Conservation du sérum à + 37° C pendant une semaine.*

On observe par I.E. une diminution de la β_1C et une augmentation de la β_1A (figure 4). L'aspect est sensiblement voisin de celui obtenu après conservation à + 4° C.

Il n'y a pas de modification du taux global de la protéine comme l'indique le tableau V ; il s'agit donc bien ici encore d'une transformation sans dénaturation.

Les moyennes et les écarts 2σ sont :

— pour 10 sérums frais	1300 $\pm$ 240 mg/l
— pour ces 10 sérums conservés 1 semaine à + 37° C	1540 $\pm$ 300 mg/l

TABLEAU V

Taux de la β_1A/β_1C globuline après conservation
du sérum à 37° C pendant une semaine.

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)	
	Sérum frais	Sérum conservé à + 37° C 1 semaine
1	1200	1200
2	1850	2300
3	1450	1850
4	450	840
5	1200	1200
6	1850	2300
7	1300	1700
8	1200	1400
9	1300	1400
10	1200	1200

d) *Conservation du sérum à 20° C pendant une semaine.*

Le cliché d'I.E. (figure 5) montre une disparition pratiquement complète de la β_1C et une augmentation très nette de la β_1A globuline.

Cette transformation est quantitative. Il n'y a pas de dénaturation comme l'indiquent les résultats du tableau VI concernant les taux de β_1A/β_1C globuline déterminés par la méthode de MANCINI.

Les moyennes et les écarts 2σ sont :

— pour 10 sérums frais	1300 $\pm$ 240 mg/l
— pour ces 10 sérums conservés 1 semaine	
à + 20° C	1370 $\pm$ 310 mg/l

TABLEAU VI

Taux de la β_1A/β_1C globuline après conservation
du sérum à + 20° C pendant une semaine.

N°	Taux de β_1A/β_1C globuline (mg/l)	
	Sérum frais	Sérum conservé à + 20 C 1 semaine
1	1200	1200
2	1850	2300
3	1450	1850
4	450	760
5	1200	1200
6	1850	2300
7	1300	1400
8	1200	1300
9	1300	1300
10	1200	1200

II. — ÉTUDE SYNTHÉTIQUE.

L'étude des significations statistiques des moyennes, indiquées sur le tableau VII, montre que seule l'inhibition du complément par chauffage du sérum à 56° C pendant 30 minutes entraîne une diminution du taux de la β_1A/β_1C globuline.

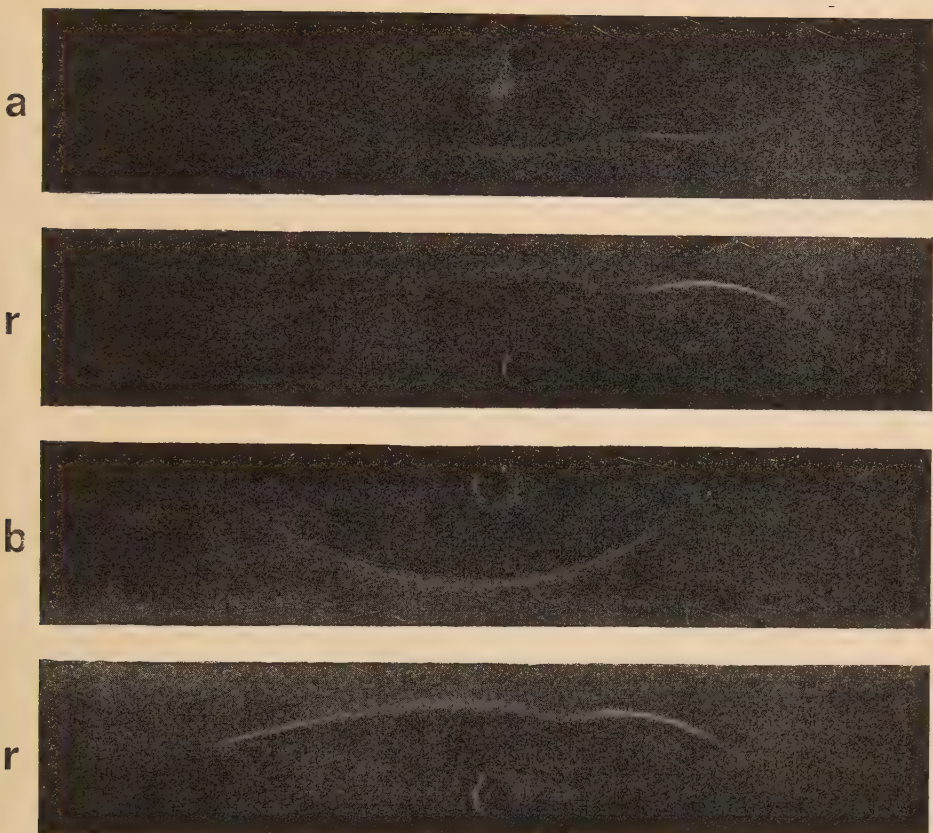


Figure 5: Etude de la β_1A/β_1C globuline d'un sérum individuel par I.E. après conservation du sérum une semaine à $+20^\circ\text{C}$ contre un antisérum spécifique anti β_1A/β_1C .

a = sérum frais

b = sérum (a) conservé 1 semaine à $+20^\circ\text{C}$

r = sérum de référence

On a, par ailleurs, lors du chauffage à 56°C observé l'existence d'un précipité au godet d'ensemencement (figure 1 b). Il est donc permis de penser que ce traitement entraîne une dénaturation partielle de la β_1A/β_1C , portant surtout sur la fraction β_1A .

La cinétique de transformation de la β_1C en β_1A est sensiblement la même à $+4^\circ\text{C}$ et à $+37^\circ\text{C}$. Par contre la transformation est paradoxalement plus rapide à $+20^\circ\text{C}$ qu'à $+4^\circ\text{C}$ ou $+37^\circ\text{C}$. La congélation du sérum à -20°C inhibe cette transformation et n'entraîne pas de dénaturation.

TABLEAU VII

Comparaison entre les valeurs moyennes de la β_1A/β_1C globuline des sérums traités ou conservés et le taux moyen de cette protéine dans les sérums frais.

+ : la différence est significative.

— : la différence n'est pas significative.

	t	α	Signification
Sérum incubé 1 H. à 37° C	0,1	0,9	—
+ zymosan	0,1	0,9	—
+ R ₃	0,3	0,5	—
Sérum décomplémenté	6	0,001	+
Sérum conservé 1 semaine à — 20° C..	0,1	0,9	—
+ 4° C..	0,03	0,9	—
+ 37° C..	1,3	0,2	—
+ 20° C..	0,4	0,5	—

B) ETUDE EN FONCTION DE L'AGE

Les sérums sont classés en trois groupes en fonction de l'âge :

- Sang du cordon à la naissance (10 cas)
- Enfants de 3 à 24 mois (20 cas)
- Enfants de 3 à 16 ans (31 cas)

Pour chaque tranche d'âge sont indiquées les valeurs des fractions sériques suivantes :

- β_1A/β_1C globuline
- Ig A
- Ig G
- Complément total (C)
- Troisième fraction C₃ du complément.

I. — ÉTUDE ANALYTIQUE.

Pour chaque tranche d'âge considérée, les valeurs obtenues pour les différentes fractions sériques étudiées sont indiquées dans les tableaux VIII, XI et X.

TABLEAU VIII

Valeurs des différentes fractions sériques étudiées
dans 10 cas de sang de cordon à la naissance.

N°	β_1A/β_1C (mg/1)	IgA (mg/1)	IgC (mg/1)	C (CH50/ml)	C ₃ (CH50/ml)
1	1000	0	17000	61	47
2	1100	90	19000	62	55
3	840	150	5000	44	33
4	1100	0	17000	71	63
5	1100	0	17000	64	50
6	1100	0	13000	61	51
7	840	0	12500	62	48
8	1100	0	11000	116	68
9	1100	0	14500	65	50
10	800	0	11000	66	53

TABLEAU IX

Valeurs des fractions sériques étudiées dans 20 cas d'enfants
âgés de 3 à 24 mois.

L'âge, le diagnostic retenu pour chacun des cas envisagés
sont indiqués dans le tableau (annexe II).

N°	β_1A/β_1C (mg/1)	IgA (mg/1)	IgC (mg/1)	C (CH50/ml)	C ₃ (CH50/ml)
1	800	400	4500	119	56
2	340	1200	12500	35	3
3	340	120	6900	20	2
4	950	1200	12600	99	36
5	1200	2760	5000	62	72
6	950	800	1700	77	48
7	1900	600	2200	132	70
8	1100	400	1700	65	73
9	1950	400	6900	132	96
10	960	800	10000	113	46
11	1000	250	8000	57	43
12	1400	250	6900	80	40
13	950	550	8000	100	54
14	1200	800	4000	132	90
15	1350	1000	10000	95	47
16	430	800	8000	94	16
17	1000	250	4000	58	52
18	1700	400	5200	93	62
19	1000	550	2600	69	72
20	840	550	3200	45	37

TABLEAU X

Valeurs des fractions sériques étudiées dans 31 cas d'enfants âgés de 3 à 16 ans.

L'âge, le diagnostic retenu de chacun des cas envisagés sont indiqués dans le tableau (annexe I).

N°	β_1A/β_1C (mg/l)	IgA (mg/l)	IgG (mg/l)	C (CH50/ml)	C ₃ (CH50/ml)
1	950	4000	17800	139	36
2	3000	2750	9600	143	69
3	950	9100	12600	134	66
4	1150	1200	4000	132	118
5	950	1200	10000	88	66
6	1900	1300	6900	60	105
7	1900	1200	13000	45	95
8	950	1200	5200	69	59
9	2100	1850	3100	74	64
10	1400	2000	6900	91	47
11	1450	2750	5200	54	69
12	1400	2900	6900	112	55
13	1350	2750	13000	63	50
14	950	1800	10000	55	54
15	950	2750	12000	56	66
16	3000	2900	13800	169	120
17	2200	800	11400	56	47
18	1150	4000	17400	72	80
19	1800	2750	14500	82	90
20	1600	800	6300	115	57
21	1600	2000	10000	139	91
22	1700	6600	21900	98	66
23	950	1850	21500	124	58
24	1150	4000	19500	88	73
25	1100	2750	21500	125	70
26	280	9100	26000	30	3
27	2200	100	400	92	54
28	1100	1200	13000	106	56
29	950	1850	21500	91	79
30	1150	1850	11400	120	70
31	1900	4000	13000	105	97

Pour chaque cas l'âge et le diagnostic retenu sont indiqués dans les tableaux annexes I et II.

TABLEAU ANNEXE I

N ^o s indiqués tableau X	Age (ans)	Diagnostics retenus
1	8	R.A.A. (+ augmentation des α_2 globulines)
2	13	R.A.A. (+ augmentation des α_2 globulines)
3	9	R.A.A. (+ augmentation des α_2 globulines)
4	10	R.A.A. (+ augmentation des α_2 globulines)
5	8	R.A.A. (α_2 globulines normales)
6	5	Bronchite + Asthme
7	5	Asthme
8	8	Asthme
9	8	Syndrome néphrotique
10	9	Suspicion de G.N.A.
11	11	Syndrome néphrotique + Albuminurie
12	12	Syndrome néphrotique
13	14	Albuminurie
14	14	G.N.A. + Hématurie
15	13	Chorée
16	14	Chorée de Sydenham
17	14	Mouvements choréiformes
18	14	Mouvements choréiformes
19	14	Comitialité
20	10	Convulsions chez un retardé
21	6	Purpura rhumatoïde
22	7	Purpura rhumatoïde
23	7	Fièvre prolongée
24	9	Fièvre prolongée
25	15	Hépatite virale
26	11	Cirrhose méta-ictérique
27	9	$\Lambda\gamma$ globulinémie congéniale
28	3	Pneumonie droite
29	6	Anémie hémolytique
30	5	Tuméfaction sous-maxillaire
31	15	Angiome osseux

TABLEAU ANNEXE II

N ^{os} indiqués tableau IX	Age (mois)	Diagnostics retenus
1	3	Déshydratation
2	3	Déshydratation + Hypotrophie
3	7	Déshydratation + Hématémèse
4	4	Déshydratation + Hypotrophie
5	8	Hypotrophie + Aneurexie
6	24	Hypotrophie + Diarrhée
7	24	Syndrome néphrotique
8	21	Syndrome néphrotique
9	6	Otites
10	17	Staphylococci pleuropulmonaire
11	17	Rhino-bronchites
12	12	Anémie aiguë
13	9	Anémie aiguë
14	4	Fièvre prolongée
15	18	Fièvre
16	24	Fièvre prolongée + Adénopathies
17	3	Ictère
18	20	Ataxie cérébelleuse
19	9	Activité prothrombinique déficiente
20	17	Obésité

Les valeurs moyennes et les écarts 2σ de chaque fraction sérique, obtenues en fonction de l'âge, sont indiquées dans le tableau XI. Les Ig A sont pratiquement inexistantes dans le sang du cordon à la naissance. L'un des deux cas où il existe une faible teneur en Ig A correspond à une incompatibilité Rhesus ; l'autre cas n'a pu être suivi après la naissance.

TABLEAU XI

Moyennes et écarts 2σ des différentes fractions sériques étudiées en fonction de l'âge.

	Sang de cordon à la naissance (10 cas)	Enfants de 3 à 24 mois (20 cas)	Enfants de 3 à 16 ans (31 cas)
β_1A/β_1C (mg/l)	1000 ± 260	1100 ± 270	1400 ± 200
1gA (mg/l)	(0)	700 ± 300	2400 ± 1200
1gC (mg/l)	13500 ± 4000	5500 ± 2500	12100 ± 3000
C (CH50/ml)	67 ± 22	80 ± 25	95 ± 21
C ₃ (CH50/ml)	52 ± 10	50 ± 20	70 ± 15

II. — ÉTUDE SYNTHÉTIQUE.

1) Recherche de corrélation.

Pour chaque groupe d'âge ont été établies les corrélations des fractions sériques prises deux par deux (tableau XII et figures 6, 7, 8, 9, 10, 11).

TABLEAU XII

Corrélation « r » entre les fractions sériques étudiées, prises deux par deux, dans le sang de cordon à la naissance.

	C (CH50/ml)		C ₃ (CH50/ml)	
	r	α	r	α
C (CH50/ml)			+ 0,9	0,01
β_1A/β_1C (mg/l)	+ 0,5	0,02	+ 0,6	0,01
1gC (mg/l)	+ 0,2		+ 0,3	
1gA (mg/l)	(0)		(0)	

a) *Sang du cordon à la naissance* (10 cas).

Comme l'indique le tableau XII, des corrélations positives ont été trouvées entre :

C et C₃
 β_1A/β_1C et C₃
 β_1A/β_1C et C

L'association la plus étroite est celle qui existe entre le complément total et la troisième fraction C₃ du complément. Dans la série étudiée, il n'apparaît aucune corrélation entre :

les Ig G et C, les Ig G et C₃, les Ig G et la β_1A/β_1C
les Ig A et C, les Ig A et C₃, les Ig A et la β_1A/β_1C

b) *Enfants de 3 à 24 mois* (20 cas).

Il existe une corrélation significativement positive entre C et C₃ (figure 6), entre la β_1A/β_1C et C₃ (figure 7), et entre la β_1A/β_1C et C (figure 8).

Par ailleurs, il n'apparaît aucune corrélation entre C et les immunoglobulines G ou A, entre C₃ et les Ig G ou Ig A et entre la β_1A/β_1C globuline et les Ig G ou Ig A.

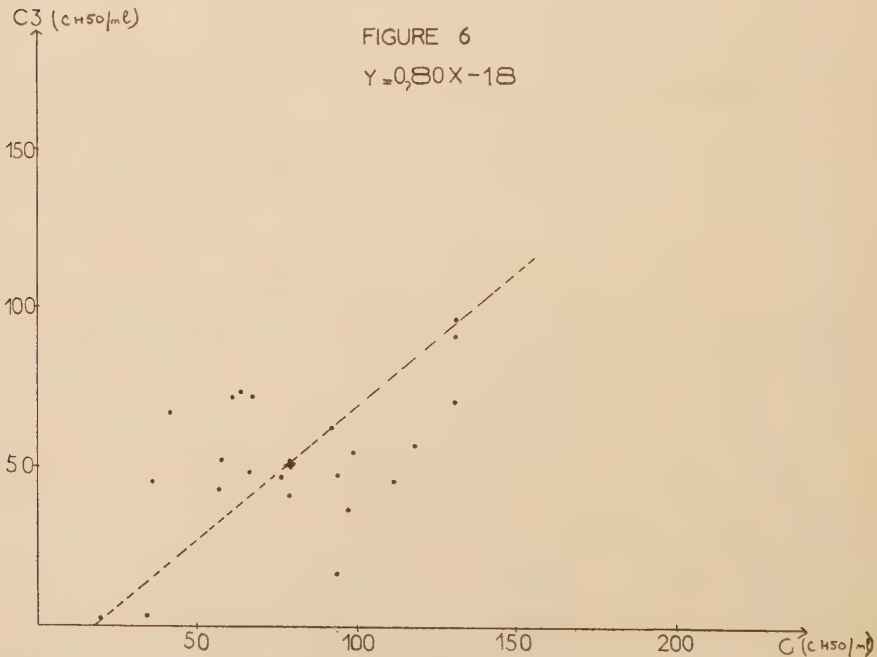


Figure 6 : Corrélation entre C et C₃ (CH 50 m/l) chez les enfants âgés de 3 à 24 mois ; $r = +0,9$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,8.

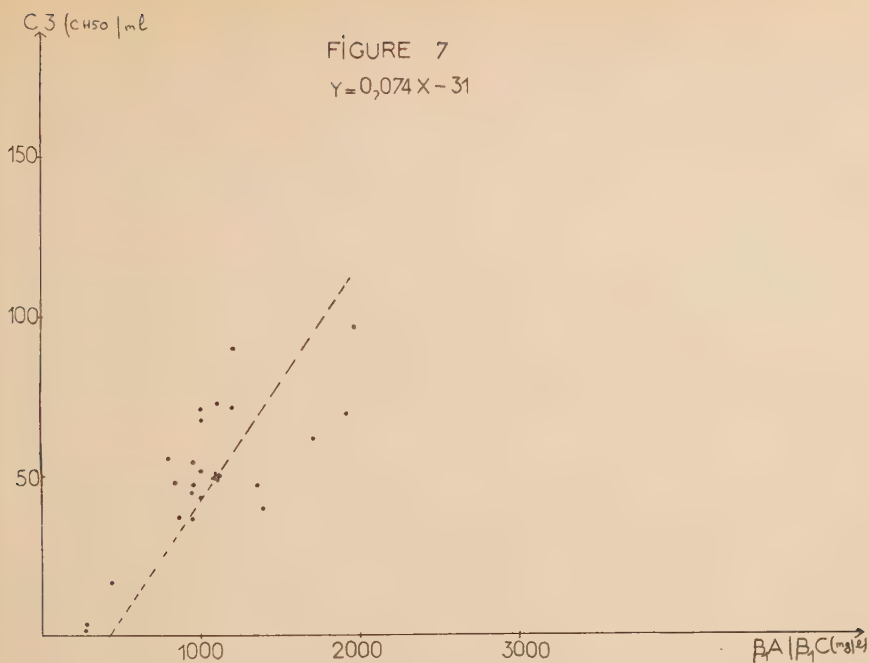


Figure 7 : Corrélation entre la β_1A/β_1C globuline (mg/l) et C_3 (CH 50/ml) chez les enfants âgés de 3 à 24 mois ; $r = +0,87$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,074.

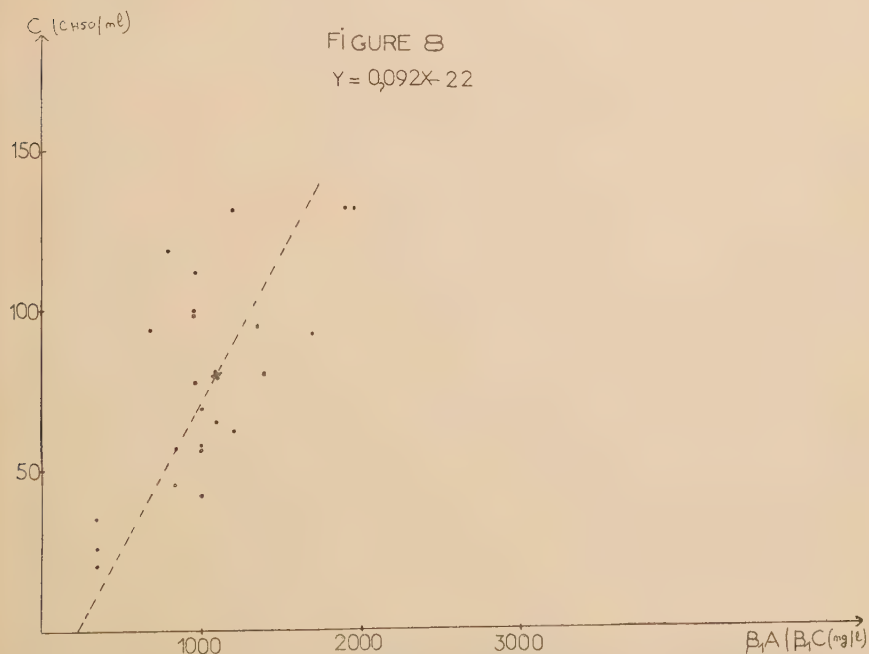


Figure 8 : Corrélation entre la β_1A/β_1C globuline (mg/l) et C (CH 50/ml) chez les enfants âgés de 3 à 24 mois ; $r = +0,80$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,092.

c) *Enfants de 3 à 16 ans (31 cas).*

La corrélation entre C et C₃ représentée par la figure 9 est très forte.

Les corrélations entre la β_1A/β_1C et C₃, entre la β_1A/β_1C et C indiquées sur les figures 10 et 11 sont significativement positives.

Comme pour les deux tranches d'âge précédentes, il n'apparaît de corrélation significative ni entre les Ig G ou Ig A et C, ni entre les Ig G ou Ig A et C₃, ni entre les Ig G ou Ig A et la β_1A/β_1C globuline.

L'étude des corrélations pouvant exister entre les fractions sériques considérées dans les trois tranches d'âge montre, comme on pouvait s'y attendre, qu'il y a une association étroite entre C et C₃ et que la β_1A/β_1C globuline a un rôle symétrique de C et de C₃. Enfin, la liaison entre β_1A/β_1C avec C₃ est plus marquée que celle avec le complément total (C).

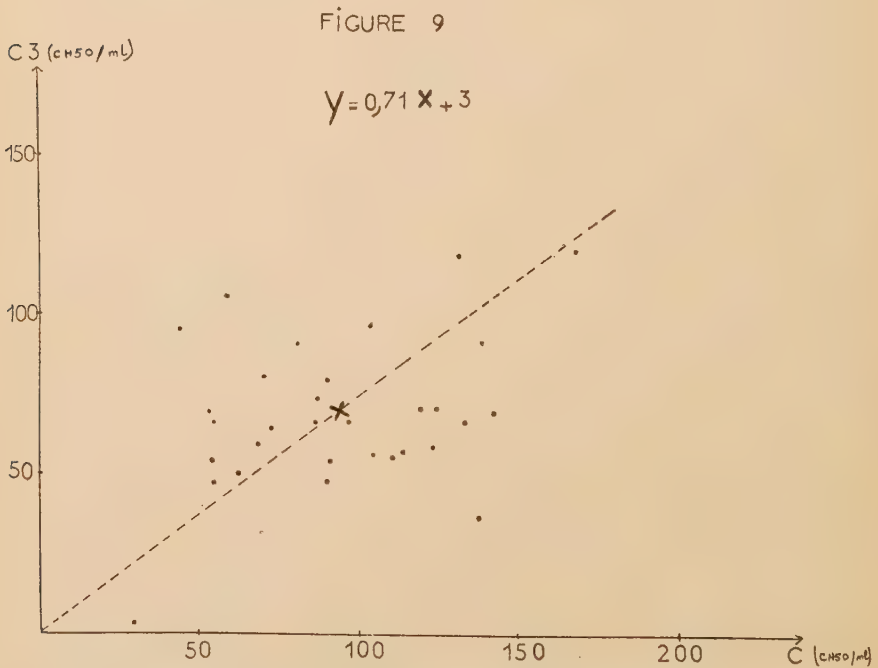


Figure 9 : Corrélation entre C (CH 50/ml) et C₃ (CH 50/ml) chez les enfants âgés de 3 à 16 ans : $r = +0,87$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,71.

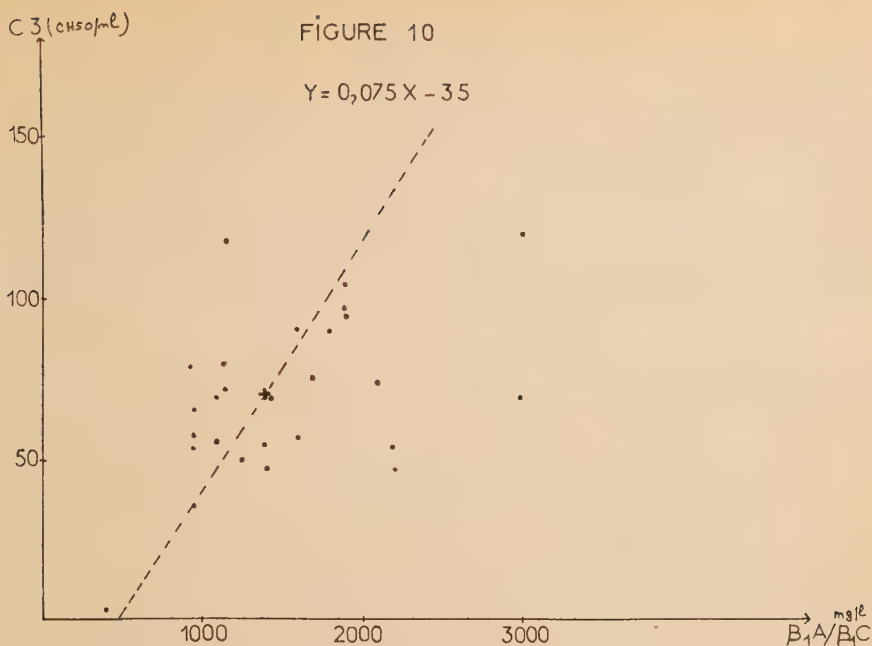


Figure 10 : Corrélation entre la B_{1A}/B_{1C} globuline (mg/l) et C_3 (CH 50/ml) chez les enfants âgés de 3 à 16 ans ; $r = +0,85$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,075.

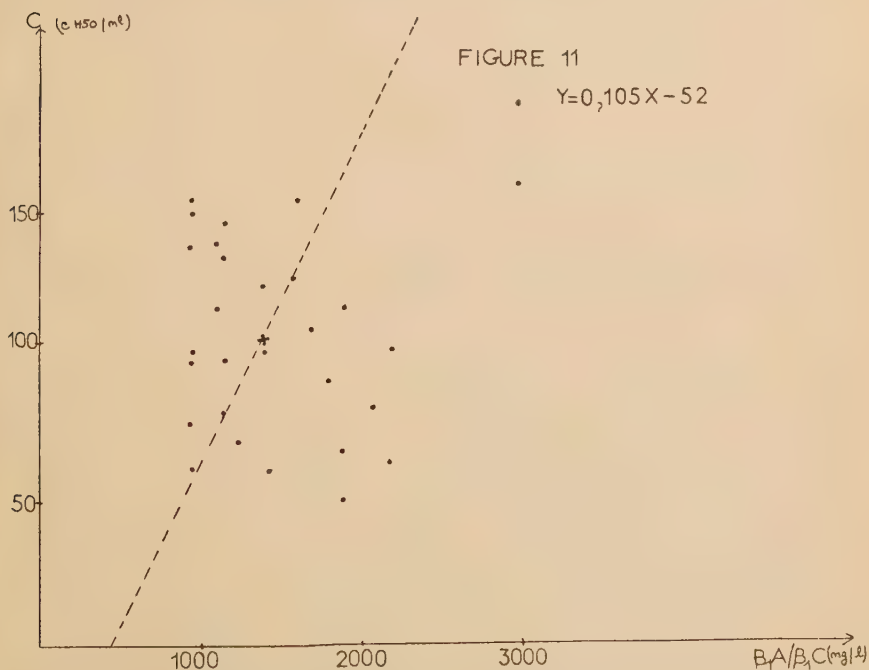


Figure 11 : Corrélation entre la B_{1A}/B_{1C} globuline (mg/l) et C (CH 50/ml) chez les enfants âgés de 3 à 16 ans ; $r = +0,80$; $\alpha < 0,01$; pente = 0,105.

2) Comparaison des moyennes observées par tranche d'âge.

La comparaison des valeurs moyennes des différentes fractions sériques indiquées sur le tableau XI montre :

- a) — *pour la β_1A/β_1C* la concentration à la naissance a une valeur subnormale par rapport à celle de l'adulte. Cette concentration se maintient dans la tranche d'âge de 3 à 24 mois et atteint le taux normal de l'adulte dans la tranche d'âge suivante de 3 à 16 ans.
- b) — *pour les Ig A*, réserve faite des deux cas pathologiques observés, la concentration, nulle à la naissance, augmente pour atteindre la valeur normale de l'adulte entre 3 et 16 ans.
- c) — *pour les Ig G* : la moyenne observée pour le sang du cordon est supérieure à celle observée dans la tranche d'âge de 3 à 24 mois tandis qu'elle atteint la valeur normale de l'adulte entre 3 et 16 ans.
- d) — *pour le complément C*, on observe une augmentation progressive de l'activité, exprimée en unité CH 50/ml, entre la naissance et la tranche d'âge de 3 à 16 ans où la valeur normale de l'adulte est atteinte.
- e) — *enfin pour le troisième facteur C_3 du complément*, l'activité à la naissance est déjà presque normale par rapport à l'adulte. Cette activité se maintient entre 3 et 24 mois, et elle atteint la valeur adulte entre 3 et 16 ans. On voit donc que l'activité des C_3 évolue parallèlement à la concentration de la β_1A/β_1C globuline.

C) ETUDE DANS QUELQUES CAS DE DYSGLOBULINEMIES CHEZ L'ADULTE

Nous avons limité notre étude à quelques cas de dysglobulinémies majeures, telles que les myélomes ou les macroglobulinémies.

1) *Dans les trois cas de myélomes à Ig G*, en plus de l'augmentation caractéristique et connue de la fraction Ig G (24 à 26 g/l), on observe une diminution des Ig A et aussi un fait moins connu qui est l'augmentation modérée de la troisième fraction C_3 du complément (supérieure à 90 unités CH 50/ml), tandis que le complément total C est légèrement diminué.

2) *Dans les deux cas de myélome à Ig A*, le stade d'évolution de la maladie étant très différent, il est difficile de tirer des conclusions. Cependant dans le cas le moins avancé (13,2 g/l d'Ig A) on observe comme dans les myélomes à Ig G une augmentation de la concentration de la β_1A/β_1C et parallèlement du taux du troisième composant C_3 du complément, tandis que le taux du complément total est diminué.

3) Dans les deux cas de *macroglobulinémie*, il faut distinguer un cas de *macroglobulinémie primitive* de WALDENSTRÖM où l'on observe une diminution secondaire des Ig A et Ig G et une baisse secondaire de plus de 50 p. 100 de la concentration en β_1A/β_1C et des taux de la troisième fraction du complément et du complément total, tandis que dans le cas de *macroglobulinémie secondaire* à une parasitose on observe seulement une légère diminution de la β_1A/β_1C et du taux du complément total.

TABLEAU XIII

Valeurs des fractions sériques étudiées dans quelques cas de dysglobulinémies chez l'adulte.

Diagnostic	β_1A/β_1C (mg/l)	IgA (mg/l)	IgG (mg/l)	C (CH50/ml)	C_3 (CH50/ml)
Macroglobulinémie secondaire	980	2750	7600	81	74
Myélome à IgG	1450	160	26000	82	97
Myélome à IgG	1250	550	24000	80	90
Myélome à IgG	1500	1850	24000	65	97
Myélome à IgA	1950	13000	6400	81	119
Myélome à IgA période terminale	1150	43000	3600	91	60
Waldenström	480	240	5000	40	30

CHAPITRE III

DISCUSSION

Les données quantitatives et corrélatives de ce travail peuvent être présentées et discutées selon les quatre points suivants :

I. — FORME DE LA β_1A/β_1C GLOBULINE DANS LE SÉRUM NATIF.

Dans les sérums normaux natifs, les deux formes β_1C et β_1A globuline coexistent dans la majorité des cas. Toutefois, nous avons observé l'existence d'une seule de ces deux formes :

— deux fois chez des enfants de moins de 24 mois, il s'agissait de la β_1C globuline ;

— quatre fois il s'agissait de la β_1A seule : chez un adulte atteint d'une maladie de Waldenström, un enfant de 11 ans présentant une cirrhose méta-ictérique, deux enfants de 3 et 7 mois hypotrophiques en déshydratation.

Ces observations ne sont pas en accord avec celles de certains auteurs (138, 164, 217) selon lesquels il n'existerait que la forme β_1C dans le sérum frais. Nous pensons, pour notre part, que la forme sous laquelle se trouve cette protéine β_1A ou β_1C ou β_1A/β_1C est la résultante de conditions physiopathologiques données.

II. — TRANSFORMATION DE LA β_1C en β_1A GLOBULINE.

L'étude de cette transformation en fonction du temps et de la température permet de penser qu'il s'agit d'une action enzymatique. En effet :

1) La protéine isolée et purifiée est beaucoup plus stable qu'en solution dans le sérum (138).

2) Il n'a pas été possible d'obtenir la réversibilité de la transformation par des facteurs physico-chimiques.

3) *Action du chauffage.*

Le chauffage à 56° C pendant 30 minutes entraîne une dénaturation de diverses protéines dont la β_1A/β_1C globuline. Mais cette dénaturation se produit surtout pour la forme non polymérisée,

c'est-à-dire la β_1A forme sérologiquement inactive, tandis que la forme polymérisée β_1C active comme troisième facteur du complément est davantage protégée. Ce qui est en bon accord avec les connaissances actuelles concernant la thermostabilité des protéines globulaires.

4) *Action du vieillissement et de la température.*

La β_1C en solution dans le sérum est labile, alors que la β_1A est stable. La transformation de la β_1C en β_1A globuline après conservation d'une semaine du sérum, est partielle à $+4^\circ C$ et à $+37^\circ C$, totale à $+20^\circ C$. Cette transformation ne s'accompagne d'aucune dénaturation de la protéine.

Le vieillissement du sérum n'est pas la seule cause de cette transformation. En effet, la β_1C est transformée en β_1A sous l'action d'enzymes estérasiques existant normalement dans le sérum telle C_{1s} estérase (11). La cinétique de disparition de la β_1C est fonction du temps et de la température, et nous fait penser que la transformation β_1C en β_1A porte sur des modifications de la structure quaternaire de la protéine.

5) *Inhibition de la transformation par congélation.*

Il n'existe pas de modification visible de la β_1C après conservation du sérum une semaine à $-20^\circ C$ (tableau III et figure 3) (138, 164, 11). A cette température, l'action protéasique serait inhibée et n'exercerait plus son action sur la forme polymérisée β_1C .

L'action de la congélation peut être mise en parallèle à celle de certains esters peptidiques de synthèse (11) qui inhibent par compétition la transformation de la β_1C en β_1A par la C_{1s} estérase.

III. — NATURE DES RAPPORTS ENTRE LA β_1C ET LE COMPLÉMENT.

En considérant l'évolution des concentrations de la β_1A/β_1C globuline et des activités complémentaires en fonction de l'âge (tableau XI) il est remarquable de constater que l'accroissement d'activités du complément total n'est pas identique à celui de la fraction C_3 , tandis que ce dernier évolue de la même manière que la β_1A/β_1C globuline. Par contre, les données corrélatives à l'intérieur de chaque tranche d'âge considérée indique qu'il existe une très forte corrélation (0,9 (tableau XII et figures 6 et 9) entre le complément total C et la troisième fraction C_3 , et que la corrélation entre C_3 et la β_1A/β_1C est plus forte que celle que existe entre C et la β_1A/β_1C .

La protéine β_1A/β_1C dont la forme sérologiquement active est la forme polymérisée β_1C apparaît donc bien comme le support moléculaire de l'activité de la troisième fraction C_3 du complément global C (198). Par ailleurs, il apparaît que le troisième composant C_3 du système complémentaire C est le « composant critique » (143).

Il est permis de penser que le facteur C_3 serait un facteur limitant dans l'action du système complémentaire et que la protéine β_1C pourrait porter un site catalytique fondamental de l'action cytolytique.

IV. — RAPPORTS POUVANT EXISTER ENTRE LE COMPLÉMENT ET LES IMMUNO-GLOBULINES.

La possibilité d'existence de tels rapports découle du pouvoir de fixation du complément par certaines immuno-globulines, en particulier les Ig G et Ig M. Mais cette propriété n'existe qu'à l'état potentiel dans les conditions physiologiques normales. Nous avons vu qu'il n'existe pas de corrélation entre les Ig G et le complément total C. Il faut que l'association antigène-anticorps se soit produite pour que la propriété de fixation du complément devienne effective. En fait, il a été démontré que les fractions du système complémentaire électivement fixées sont la deuxième C_2 et la quatrième fraction C_4 (96).

Nous pouvons penser que la troisième fraction C_3 interviendrait ensuite comme agent catalytique de la cytolyse activé par les facteurs chimiotactiques (C_5 , C_6 , C_7). Cette hypothèse peut être soulevée après analyse des résultats des dosages obtenus dans les dysglobulinémies (tableau XIII).

Dans les cas de myélomes à Ig G on observe une augmentation de la protéine spécifique Ig G et une diminution de l'activité du complément total, tandis que l'activité C_3 et le taux de la β_1A/β_1C globuline sont augmentés. Les paraprotéines myélomateuses fixent anormalement C_2 et C_4 .

Pâr contre, lors d'une agression immunitaire, la formation d'un complexe antigène-anticorps entraîne la consommation de tous les facteurs du complément et du complément total C qui ne fait que remplir sa propre fonction. Dans ce cadre entrent les cas d'hypo-complémentémie au cours des affections infectieuses et inflammatoires accompagnées de cytolyse et peut-être les macroglobulinémies de WALDENSTRÖM par autoanticorps.

Enfin, du point de vue développement, l'analyse des dosages des Ig G, de la β_1A/β_1C et les activités complémentaires C_3 et C total montre que le fœtus et le nouveau-né ne sont pas dépourvus de défenses immunitaires (196).

Les Ig G apparaissent être d'origine maternelle puisqu'elles s'effondrent à partir du troisième jour de la naissance jusqu'à la quatrième semaine (61), pour remonter et atteindre la valeur normale adulte entre 3 et 16 ans (tableau XI).

Les Ig A sont absentes chez le fœtus et le nouveau-né (tableau XI) (216). Il en est de même pour les Ig M (199). Pour les cas

pathologiques (incompatibilités fœto-maternelles) où l'on a observé l'existence d'Ig A à la naissance, on ne peut dire si elles sont d'origine fœtale ou maternelle.

La β_1A/β_1C et la troisième fraction C_3 du complément existent à la naissance à un taux subnormal par rapport à celui de l'adulte. Ce taux se maintient durant les premiers mois de la vie et s'accroît légèrement entre 3 et 16 ans. Il est donc probable que la protéine β_1A/β_1C et C_3 qu'elle supporte sont synthétisés par le fœtus. Par contre, l'activité du système complémentaire total qui n'existe qu'à un taux de 60 p. 100 à la naissance (tableau VIII) (32) s'accroît progressivement après la naissance ; la maturation du complément total dépend donc de celle des facteurs autres que le troisième composant C_3 .

RESUME ET CONCLUSION

Le but principal de notre travail était d'apporter une contribution expérimentale à l'étude de la β_1A/β_1C globuline et des rapports pouvant exister entre la fraction β_1C et le troisième composant C_3 du complément.

La β_1A/β_1C globuline du sérum natif se présente, sur les diagrammes d'I.E., comme une ligne de précipitation continue à double courbure, de mobilité électrophorétique β_1 :

- la β_1C est la fraction de mobilité lente,
- la β_1A celle de mobilité rapide.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'action de quelques facteurs physico-chimiques agissant sur la transformation de la β_1C fraction polymère, sérologiquement active en β_1A forme dépolymérisée et sérologiquement inactive.

Pour l'étude de l'action de chaque agent physique ou chimique sur la β_1A/β_1C globuline une I.E. et une détermination quantitative de la β_1A/β_1C par immuno-diffusion radiale ont été effectuées sur 10 sérums avant et après le traitement.

1) L'inhibition du complément par chauffage du sérum à $56^\circ C$ pendant 30 minutes entraîne une dénaturation des protéines sériques et en particulier de la fraction β_1A (figure 1, tableau I). La β_1C globuline semble moins sensible à l'action de la chaleur.

2) L'action du zymosan ou du réactif R_3 qui inhibe la troisième fraction C_3 du complément n'entraîne aucune variation quantitative de la β_1A/β_1C globuline (tableau II). R_3 ne provoque aucune modification des arcs de précipitation β_1A et β_1C (figure 2 d), et de C_3 . Tout au plus, l'action du zymosan se traduit par une légère diminution de la fraction β_1C (figure 2 c).

3) La β_1C globuline en solution dans le sérum est labile, alors que la β_1A est stable. La transformation de la β_1C en β_1A globuline

après conservation du sérum pendant une semaine est partielle à $+4^{\circ}\text{C}$ et à $+37^{\circ}\text{C}$ (figure 4), totale à $+20^{\circ}\text{C}$ (figure 5). Cette transformation ne s'accompagne d'aucune dénaturation de la protéine (tableaux IV, V, VI). Toutefois, on n'observe pas de modification tant au point de vue qualitatif, qu'au point de vue quantitatif de la $\beta_1\text{A}/\beta_1\text{C}$ globuline après conservation du sérum une semaine à -20°C (tableau III et figure 3); à cette température, l'action protéasique qui entraîne cette transformation $\beta_1\text{C}$ et $\beta_1\text{A}$ serait inhibée. La cinétique de disparition de la $\beta_1\text{C}$ en fonction de la température et du vieillissement nous fait penser que la transformation $\beta_1\text{C}$ en $\beta_1\text{A}$ porte sur des modifications de la structure quaternaire de cette protéine.

Dans un deuxième paragraphe, nous avons déterminé, pour chaque sérum, les fractions suivantes : la $\beta_1\text{A}/\beta_1\text{C}$ globuline, les immunoglobulines Ig G et Ig A, le complément total C et sa troisième fraction C_3 . Les sérums étudiés sont classés en trois groupes en fonction de l'âge :

- Sang du cordon à la naissance (10 cas) (tableau VIII)
- Enfants de 3 à 24 mois (20 cas) (tableau IX et tableau annexe II)
- Enfants de 3 à 16 ans (31 cas) (tableau X et tableau annexe I)

Nous avons établi les moyennes et les écarts 2σ de chaque fraction sérique pour chacune des trois tranches d'âge (tableau XI).

L'étude des corrélations pouvant exister entre les fractions considérées dans les trois tranches d'âge montre, comme on pouvait s'y attendre, qu'il y a une corrélation étroite entre le complément total C et son troisième composant C_3 , que la $\beta_1\text{A}/\beta_1\text{C}$ globuline a un rôle symétrique de C et de C_3 ; la liaison entre la $\beta_1\text{A}/\beta_1\text{C}$ et C_3 est plus marquée que celle entre la $\beta_1\text{A}/\beta_1\text{C}$ et C (figures 6 à 11, tableau XII).

La $\beta_1\text{C}$ est vraisemblablement le support moléculaire de C_3 .

Nous avons, dans la deuxième partie de l'étude synthétique de ce paragraphe, comparé les moyennes de chacune des fractions sériques, observées par tranche d'âge pour tenter de suivre leur évolution avec l'âge (tableau XI).

Enfin, dans un troisième paragraphe, nous avons groupé quelques cas de dysglobulinémies majeures chez l'adulte (tableau XIII).

- 3 cas de myélome à Ig G
- 2 cas de myélome à Ig A
- 2 cas de macroglobulinémie.

Comme suite à ces résultats expérimentaux, et d'après les connaissances actuelles sur la β_1A/β_1C globuline et le complément, nous avons essayé de discuter les quatre points suivants :

- Forme de la β_1A/β_1C globuline dans le sérum natif.
- Transformation de la β_1C en β_1A globuline.
- Nature des rapports entre la fraction β_1C et le complément.
- Rapports pouvant exister entre le complément et les immuno-globulines.

L'étude ébauchée dans ce travail sur la détermination systématique des fractions sériques (β_1A/β_1C globuline, Ig G, Ig A, complément C et C_3), pourra, peut-être aboutir à l'établissement de signes biologiques de cas pathologiques définis.

Vu : *le Président de Thèse,*

G. DASTUGUE

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

n° Ph 9/70

A Clermont-Ferrand le 27 octobre 1970

Le Doyen,

G. MEYNIEL

BIBLIOGRAPHIE

1. AFONSO E. — *Clin. Chim. Acta*, 1964, 10, 114.
2. AFONSO E. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 567.
3. AFONSO E. — *Clin. Chim. Acta*, 1968, 21, 283.
4. ALLEN D.W., SCHRÖEDER W.A., BALAG J. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, 80, 1628.
5. ALLEN E., SCHWEET R.S. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 760.
6. ALPER C.A., LEVIN A.S., ROSEN F.S. — *Meeting of American Soc. of Clin. Invest. Atlantic. City New-Jersey*. May, 1962, p. 2.
7. ALTER A.A., LEE S.L., POMFAR M., DOBBIN G. — *J. Clin. Invest.*, 1962, 41, 1341.
8. AMBROSIUS H. — *Z. Immuno., Forsch.*, 1966, 130, 41.
9. AMBROSIUS H. — *Nature*, 1966, 209, 524.
10. AMBROSIUS H. — *Clin. Chim. Acta*, 1967, 18, 279.
11. ANDRE A., PEETOOM F., PONDMAN K.W. — *Protides of Biol. Fluids 10 th. Coll. Bruges* (1962), 1963, 10, 241.
12. ASKONAS B.A., HUMPHREY J.H. — *Biochem. J.*, 1958, 70, 212.
13. AUDRAN R., STEINBUCH M. — *Path. Biol.*, 1966, 14, 838.
14. AUSTEN K.F., SCHEFFER AL. — *New England. J. Med.*, 1965 272, 649.

15. BACKHAUSZ R. — *Immunodiffusion and Immuno-Electrophorèse*. V.E.B.G. Fischer. Verlag Jena, 1967.
16. BAGLIONI C. — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1962, 48, 1880.
17. BAITSCH H., LEIBRICH K.G. — *Blut.*, 1961, 7, 27.
18. BAMMER H. — *Klin. Wschr.*, 1963, 41, 1084.
19. BARADUM S., NUSSLE D., WITSCHI H.P., BUSER F. — *Schweiz., med. Wschr.*, 1962, 92, 316.
20. BARGAB J., CLEVE H., HARTMANN F. — *Dtsch. Arch Klin. Med.*, 1958, 204, 708.
21. BECKER E.L. — *J. Immunol.*, 1960, 84, 210.
22. BECKER W. — *Klin. Wschr.*, 1967, 45, 389.
23. BEDNARIK T. — *Clin. Chim. Acta*, 1967, 17, 132.
24. BENHOLD H., KALLER E. — *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 863.
25. BENJAMIN D.C., WEIMER H.E. — *J. Immunology.*, 1963, 91, 331.
26. BERG R. — *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1963, 59, 369.
27. BERNARD A., KÖCHLING. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, 74, 2649.
28. BIER O.G., LEYTON G., MAYER M.M., HEIDELFERG M. — *J. Exp. Med.*, 1947, 81, 449.
29. BIGALOW F.S. — *Clin. Res.*, 1962, 10, 196.
30. BISERTE G., HAVAZ R., HAYEM A., LATURAZE J. — *Acad. Sci.*, 1960, 250, 418.
31. BRÉCY H., ANDRÉ A., HARTMAN L. — *Rev. Fr. Et. Clin Biol.*, 1967, 19, 1024.
32. BRÉCY H., LAGRUE G., HARTMAN L. — *Ann. Biol. Clin.*, 1969, 27, 451.
33. BRÉCY H., OLLIER M.P., FILITI WURMSER S., HARTMAN L. — *Bull. Sol. Chim. biol.*, 1969, 51, 601.
34. BUCHNER M. — *Modern Chemische Methoden in der Klink*. V.E.B.G. Thieme, Leipzig, 1961.
35. BURTIN P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1021.

36. CHRÉTIEN J. — *Sem. Hôp. Paris.*, 1965, 4, 1084.
37. CHRISTIAN C.L. — *J. Immunol.*, 1960, 84, 112 et 117.
38. CHORDI A., KAGAN I.G. — *J. Immunology*, 1964, 93, 439.
39. CLARCK H.G.M., FREEMAN T. — *Protides of Biological Fluids*, XIV, th. Coll. Bruges 1966, 1967, 14, 503.
40. CLAUSEN J. — *Acta Psychiat. Scand.*, 1960, 35, 11.
41. CLAUSEN J., HEREMANS J.F. — *J. Immunology*, 1960, 84, 128.
42. CLAUSEN J. — *Sciences Tools*, 1963, 10, 29.
43. CLEVE H., SCHWICK G. — *Z. Naturforsch.*, 1957, 12 B, 375.
44. CLEVE H., HARTMAN F. — *Klin. Wsch.*, 1957, 35, 334.
45. CLEVE H. — *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1959, 205, 513.
46. CLEVE H., HARTMAN F. — *Internst. Praxis*, 1961, 87, I.
47. O'CONNEL E.J., ENRIQUEZ P., LINMAN J.W., GLEISH G.J., McDUFFIE F.C. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1967, 70, 715.
48. CROWLE A.J. — *Immunodiffusion*. Academic Press. New-York et London, 1961.
49. DAVIS B.D., RABAT E.A., HARRIS A.D., MOOKE D.H. — *J. Immunol.*, 1944, 49, 223.
50. DONALDSON V.H., EVANS R.R. — *Amer. J. Med.*, 1963, 35, 37.
51. DOREY D.A. — *Immunology*, 1960, 3, 325.
52. DURIEUX J., KAMINSKI M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 1445.
53. EPSTEIN S.W., DABISKY S., FITZGERALD J.D.L. — *J. Allergy*, 37, 116.
54. FAHEY J.L., Mc KELVEY E.M. — *J. Immunology*, 1965, 94, 84.
55. FEINBERG J.C. — *Int. Arch. Allergy*, 1957, 11, 129.
56. FINE J.M., BOFFA G.A., DRILHON A. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1963, 114, 651.
57. FOUCAUT M., GOUEMAND M. — *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1961, 6, 446.
58. FRIES P., ZECH P., BRUMAT N., BOULETREAU P., TRAEGER J. — *Lyon Méd.*, 1958, 9, 507.
59. GABL F., WACHTER H. — *Proc. 10 th. Colloquium Protides of Biological Fluids*, 1963, 10, 230.
60. GAZZANIGA P.P., DI MACCO G., SONNINO F.R. — *Experientia*, 1963, 19, 419.
61. GITLIN D., KUMATE J., URRUSTI J., MORALES C. — *J. Clin. Invest.*, 1964, 43, 1938.
62. GORDON A.H., KEIL B., SEBASTA K., KNESSELL O., SORM F. — *Coll. Tr. Chim. Tchecosl.*, 1950, 15, I.
63. GRABAR P., WILLIAMS C.A. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193.
64. GRABAR P., BURTIN P. — *Analyse immuno-électrophorétique*. Masson, Paris, 1960.
65. GRABAR P. — *Protein., Chem.*, 1958, 13, I.
66. GRABAR P., GITLIN D. — *Analyses immuno-électrophorétiques*. Masson, Paris, 1960, 151.
67. GRABAR P. — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1957, 69, 591.
68. GRABAR P. — *Adv. In. Protein. Chemistry*, 1958, 13, 51.
69. GROSS R., SCHWICK H.G., LANG N., NIES D., EWE K., BECKER M., RAHN B., HENGSTMAN H. — *Klin. Wschr.*, 1963, 41, 695.
70. GRUNBAUM B.W., ZEC J., DURRUM E.L. — *Microchem. J.*, 1963, 7, 41.
71. GRUPE W.E. — *Pediatrics*, 1968, 42, 474.
72. GUNN W.C. — *J. Path. Bact.*, 1914-1915, 19, 155.
73. HABICH H., HASSIG A. — *Vox sang.*, 1953, 83, 1043.
74. HAFERKAMP O. — *Wirschows. Arch. Path. Anat.*, 1962, 335, 298.

75. HALLERMANN W., KIWI M., STURNER K.H. — *Dtsch. Z. gerichth. Med.*, 1963, 54, 394.
76. HANSON A., BERGGARD I. — *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 828.
77. HARTMAN L., BURTIN P., GRABAR P., FAUVERT R. — *C.R. Acad. Sci.*, 1956, 243, 193.
78. HARTMAN L., BRÉCY H. — *Ann. Biol. Clin.*, 1969, 27, 559.
79. HAVEZ R., BONTE M., MOSCHETTO Y. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 223.
80. HAYWARD B.J., AUGUSTIN R. — *Int. Arch. Allergy.*, 1957, 11, 192.
81. HEGBUS A., GREINER H. — *Z. Immun. Forsch.*, 1938, 92, 1.
82. HEIDELBERG M., KENDALL F.E. — *J. Exp. Med.*, 1932, 55, 555.
83. HEILMEYER L., KELLER W., VIVEL O., KEIDERLING K., BETKE K., WOHLER F., SCHULTZE H.E. — *Dtsch. Med. Wschr.*, 1961, 86, 1745.
84. HEREMANS J.F. — *Les glycoprotéines sériques*. Ed. Masson, 1960.
85. HEREMANS J.F. — *Med. Kinderheik (Neue Folge)*. 1963, 20, 169.
86. HIRSCHFELD J. — *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1959, 47, 160.
87. HIRSCHFELD J. — *Progress. Allergy*, 1962, 5, 155.
88. HITZIG W.H., GLIEDON A. — *Proc. 6 th. — Congr. Eur. Soc. Hématol.*, Copenhagen, 1957.
89. HITZIG W.H. — *Helv. Paediat. Acta*, 1961, 16, 46.
90. HITZIG W.H. — *Inter. Arch. Allergy*, 1961, 19, 145.
91. HITZIG W.H. — *Inter. Arch. Allergy*, 1961, 19, 284.
92. HOCHWALD G.M., THORBECKE G.J. — *Arch. Biochem. Biophysic.*, 1963, 101, 325.
93. HOLMBERG G.G., LAURELL C.B. — *Acta Chem. Scand.*, 1951, 5, 921.
94. HOLZER H.K., BINZUS G. — *Proc. XII. — Intern. Congr. Intern. Med.*, Munich, 1963, 2, 53.
95. HYMAN L., BRIAVA C.G., GOSSMAN A. — *J. Lab. Clin. Méd.*, 1964, 64, 871.
96. ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., SALMON S., FUDENBERG H.H. — *J. Immunol.*, 1967, 99, 82.
97. JENNINGS R.K. — *J. Immunol.*, 1956, 77, 156.
98. KABAT E.A., MAYER M.M. — *Expérimental Immuno-chemistry*. Thomas Springfield, 1963.
99. KAHN M.F. — *Méd. Infant.*, 1965, 72, 437.
100. KAMINSKI M. — *Biochem. Biophys. Acta.*, 1954, 13, 215.
101. KAMINSKI M., DURIEUX J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1037.
102. KAMINSKI M. — *Pub. Sci. Tech. Ministère*, 1955, Air No, NT. 59.
103. KANZOW U. — *Dtsch. Med. Wschr.*, 1962, 87, 1979.
104. KLEMPERER M.R., GOTOFF S.P., ALPER C.A., LEWIN A.S., ROSEN F.S. — *Pediatrics*, 1965, 35, 765.
105. KLEMPERER M.R., WOODWORTH H.C., ROSEN F.S., AUSTEN K.F. — *J. Clin. Invest.*, 1966, 45, 880.
106. KNEDEL M. — *Ve Coll. Hôp. St. John.*, Bruges, 1957, 72.
107. KNUCHEL F. — *Z. Gerichth. Med.*, 1961, 51, 464.
108. KOHN J. — *Nature*, 1957, 180, 986.
109. KRAUS R. — *Win. Klin. Wschr.*, 1897, 10, 736.
110. KREUTZER H.H., FENNIS W.H.S. — *Clin. Chim. Acta.*, 1964, 9, 404.
111. LACHMAN, P.J., MULLER-EBERHARD H.J., KUNKELL H.G. — *J. Exp. Méd.*, 1962, 115, 63.
112. LAGRUE G., BRÉCY H., BARIETY J., MILLIEZ P., HARTMAN L. — *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1967, 49, 90.
113. LAGRUE G., BRÉCY H., HARTMAN L. — *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1969, 51, 346.
114. LAMY M., FRÉZAL J., POLONOVSKI J., DRUEZ G., REY J. — *Pediatrics*, 1963, 31, 227.
115. LANGE K. WASSERMAN E., SLOBODY L.B. — *Ann. Intern. Méd.*, 1960, 53, 639.

116. LAURELL C.B., LAURELL S., LUNDH B. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, 14, 190.
117. LAURELL C.B. — *Analyt. Biochem.*, 1965, 10, 358.
118. LAURELL C.B. — *Analyt. Biochem.*, 1966, 15, 45.
119. LAURELL C.B. — *Protides of Biological Fluids*, XIV th. Coll. Bruges, (1966), 1967, 14, 499.
120. LAURELL C.B. — *Immunology*, 1967, 12, 313.
121. LEITHOFF H., LEITHOFF J. — *Med. Welt.*, 1962, 181.
122. LÉON M.A. — *J. Immunol.*, 1956, 76, 428.
123. LEPOW I.H., RATNOFF O.D., PILLEMER L. — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1956, 92, 111.
124. LEPOW H.I., PILLEMER L., SCHENBERG M.D., TODD E.W., WEDWOOD R.J. — *J. Immunol.*, 1959, 83, 428.
125. LEPOW I.H. — *Symposium on Complement - Sci.*, 1963, 141, 738.
126. LEPOW I.H., NAFF G.B., TODD E.W., PENSKE J., HINZ C.F. — *J. Exp. Med.*, 1963, 117, 983.
127. LEVINE L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 18, 283.
128. LÉVY G., POLONOVSKI J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, 40, 1293.
129. LINSKOTT W.D., NISBICRA K. — *J. Exp. Med.*, 1963, 118, 795.
130. LUNDH B. — *Scand. J. Clin. et Lab. Invest.*, 1964, 16, 108.

131. MANCINI G., WAERMAN J.P., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F. — *Protides of Biological Fluids. XII th Coll. Bruges* (1964), 1965, 12, 370.
132. MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.P. — *Immunochim.*, 1965, 2, 235.
133. MARCUS D.M. — *J. Immunol.*, 1960, 84, 273.
134. MARDINEY M.R. J., MULLER-EBERHARD H.J. — *J. Immunol.*, 1965, 94, 877.
135. MARKI H.H., WUHRMANN F. — *Schweiz. Med. Wschr.*, 1963, 93, 1381.
136. MULLER-BEISENHIRTZ W., KELLER H. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, 13, 95.
137. MULLER-EBERHARD H.J., KUNKEL H.G. — *J. exp. Med.*, 1956, 104, 253.
138. MULLER-EBERHARD H.J., NILSSON U., ARONSO T. — *J. Exp. Med.*, 1960, 111, 201.
139. MULLER-EBERHARD H.J. — *J. Exp. Med.*, 1960, 111, 217.
140. MULLER-EBERHARD H.J. — *Acta Soc. Med.*, 1961, 66, 152.
141. MULLER-EBERHARD H.J. — *Second Intern. Symposium on Immuno-pathol.* Grabar P. et Miescher P. Eds. N.Y. Grune. Stratton, 1961, p. 23.
142. MULLER-EBERHARD H.J., BIRO C.E. — *J. Exp. Med.*, 1963, 118, 447.
143. MULLER-EBERHARD H.J. — *Advan. Immunol.*, 1968, 8, I.
144. MURALT G. De. — *Habilitationschrift*, Univ. Bern., 1962.
145. MUSH A., BIETH P., METAIS R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1968, 26, 939.
146. MIYASOTO F., POLLAK V.E., BARCELO R. — *Arth. Rheum.*, 1966, 9, 308.

147. NAIN R.C. — *Fluorescent Protein Tracing*. E. Livingston Ltd. Edinburg, Und London, 1964.
148. NELSON T.L., STROUP G., WEDDEL R. — *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1964, 42, 237.
149. NILSSON U.R., MULLER-EBERHARD H.J. — *J. Exp. Med.*, 1965, 122, 277.

150. OFF H., MARINIS S. — *Proc. 11 th. Coll. Protides of Biological Fluids Bruges*, (1963), 1964, 11, 408.
151. OGG C.S., CAMERON J.S., WHITE R.H.R. — *Lancet*, 1968, 2, 78.
152. ONCLEY J.L., STACHARD G., BROWN A. — *J. Physic. and Colloid Chem.*, 1947, 51, 184.
153. ORDEN D.E. Van. — *Immunochim.*, 1968, 5, 497.
154. OSLER A.G. — *Immunol.*, 1961, I, 131.
155. OUCHTERLONY O. — *Arkiv. Kemi-Mineral Geol.*, 1948, 26 B, 193.
156. OUCHTERLONY O. — *Progr. Allergy*, 1958, 5, I.
157. OUCHTERLONY O. — *Progr. Allergy*, 1962, 6, 30.
158. OUDIN J. — *C.R. Séances Acad. Sci.*, 1946, 222, 115.
159. OUDIN J. — *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 1949, 228, 1890.

160. OUDIN J. — *C.R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 270.
161. OUDIN J. — *J. Exp. Med.*, 1960, 112, 125.
162. OUDIN J., DRAY S., DUBISKI S., KELUS S., LENNOX AS. S. — *Nature*, 1962, 195, 785.
163. OUDIN J., CELL J. — *Physiol.*, 1966, 67, 77.
164. PEETOOM F., VAN DER HART M., VAN LOGHEM J.J. — *Communication Congrès Soc. Europ. Hématologie*, Londres, 1959, Part. II, 1960, p. 1146.
165. PEETOOM F., PONDNAM K.W. — *Protides of Biological. Fluids 8 th Coll. Bruges*, (1960), 1961, 8, 298.
166. PEETOOM F., PONDNAM K.W., KRAMER E. — *Vox. Sang.*, 1963, 8, 605.
167. PEETOOM F. — *The agar precipitation technique and its application as a diagnostic and analytical method*. H.E. Stenfort, Kroese teiden, 1963.
168. PONDNAM K.W., PEETOOM F. — *Immunochem.*, 1964, I, 65.
169. PONDNAM K. — *Onderzoek Over properdine and complement*. Thèse, Amsterdam, 1960.
170. PRIOLISI A., GUIFFRE L. — *Acta Haemat.*, 1965, 33, 210.
171. PROKOP H., UHLENBRUCK G. — *Lehrbuch. der menschliche blut und serum Gruppen*, V.E.B.G. Thieme, Leipzig, 1963.
172. PUISSANT A., DANIEL F. — *Rev. Méd.*, 1965, 9, 739.
173. RAPP H.J., BORSOS T. — *Sci.*, 1963, 141, 738.
174. RATNOFF O.D., LEPOW I.H. — *J. Exp. Med.*, 1957, 106, 317.
175. RATNOFF O.D., LEPOW I.H., LÉVY L.R. — *J. Exp. Med.*, 1958, 107, 451.
176. REISS A.M., PLESCIA O. — *Sci.*, 1963, 101, 812.
177. REJNECK J., BEDARIK T. — *Clin. Chim. Acta*, 1960, 5, 250.
178. ROBERTS R.C., MAHEY D.G., SEAL U.S. — *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 4907.
179. ROSEMBERT L.T. — *Ann. Rev. of Microbiology*, 1965, 19, 285.
180. SALVINIEN J., KAMINSKI M. — *C.R. Acad. Sci.*, 1955, 240, 257.
181. SANDOR J. — *Transfusion*, 1967, 3, 10.
182. SASSEN A., KENNES F., MAISIN J.R. — *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.*, 1963, 8, 366.
183. SCHEIDEGGER J.J. — *Int. Arch. Allergy*, 1955, 7, 103.
184. SCHEIDEGGER J.J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 45.
185. SCHULTZE H.E., SCHWICK G. — *Clin. chim. Acta*, 1959, 4, 15.
186. SCHULTZE H.E., HEIDE K., HAUPT H. — *Naturwisch.*, 1961, 48, 496.
187. SCHULTZE H.E. — *Naturwiss.*, 1962, 83-84, 415.
188. SCHULTZE H.E., HEIDE K., HAUPT H. — *Klin. Wsch.*, 1962, 40, 729.
189. SCHULTZE H.E. — *Molecular - Biology of Human proteins*. N.Y., 1966.
190. SCHWICK G., ESSER H.O., KOCHR F. — *Behrigweg. Mitteilungen*, 1959, 35, 11.
191. SCOLARI L., PICARD J.J., HEREMANS J.F. — *Clin. Chim. Acta*, 1968, 19, 25.
192. SÉLIGMAN M. — *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1958, 3, 558.
193. SÉLIGMAN M. — *Rev. Hématol.*, 1958, 13, 239.
194. SÉLIGMAN M. — *Analyse Immuno-électrophorétique* (P. GRABAR). Ed. Masson, Paris, 1960, p. 210.
195. SHARLES H.E., REMMERS A.R., HERRING M.E. — *Texas State J. Med.*, 1964, 60, 116.
196. SMITH R.T. — *Pediat. Clin. N. Amer.*, 1960, 7, 269.
197. STEINBUCH M. — *Vox Sang.*, 1964, 9, 96.
198. STEINBURG M. — *XIII^e Journées d'Allergies*, 1970, Clermont-Ferrand.
199. STIEMM E.R., FUDENBERG H.H. — *Pediatrics*, 1966, 37, 715.
200. SUDHOF H., WALTER B. — *Clin. Chim. Acta*, 1963, 8, 434.
201. SZABO G., GERGELY J., MAGYAR Z. — *Experientia*, 1963, 19, 98.
202. TAYLOR A.B., LEON M.A. — *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.*, 1959, 101, 587.
203. TAYLOR A.B., LEON M.A. — *Fed. Proc.*, 1961, 20, 19.

204. TISSELIUS A., KABAT E.A. — *J. Exp. Med.*, 1939, 69, 119.
205. TORISU M., ARATA M., SONOZAKI H., MAJIMA H. — *J. Immunol.*, 1967, 99, 629.
206. TOWNES A.J., STEWARD C.R.J., OSTER A.G. — *Bull. Hopkins, Hosp.*, 1963, 112, 202.
207. TUREEN L.I., WARECKA K., YOUNG P.A. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1966, 122, 739.

208. URIEL J., GRABAR P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 1253.
209. URIEL J. — *Clin y laboratorio.*, 1958, 65, 87.
210. URIEL J. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 101, 104.
211. URIEL J. — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1963, 103, 956.
212. URIEL J., GRABAR P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, 90, 427.

213. WALDENSTRÖM J. — *Acta. Med. Scand.*, 1944, 117, 216.
214. WARD P.A., COCHRANE C.C. — *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 215.
215. WENDT G.G., THEILE U. — *Dtsch. Med. Wschr.*, 1963, 88, 696.
216. WEST C.D., HONG R., HONG H.H. — *J. Clin. Invest.*, 1962, 41, 2054.
217. WEST C.D., NORTHWAY J.D., DAVIS N.C. — *J. Clin. Invest.*, 1964, 43, 1507.
218. WEST C.D., HOLLAND N.H., Mc CONVILLE J.M., Mc ADAMS A.J. — *J. Pediat.*, 1965, 67, 1089.
219. WEST C.D., HOLLAND N.H., Mc CONVILLE J.M., Mc ADAMS A.J. — *J. Pediat.*, 1965, 67, 1113.
220. WIEME R.D., RABAAY M. — *Naturwiss.*, 1957, 44, 112.
221. WIEME R.J. — *Agar. Gel Electrophoresis*; Elsevier, Publishing. Co Amsterdam-London, N.Y., 1965.
222. WILLIAMS C.A., GRABAR P. — *J. Immunology*, 1955, 74, 397.
223. WILLIAMS C.A. — *Evolutionary. Genet. Biol. Primates*, 1964, 2, 25.
224. WILLIAMS R.C., LAW D.M. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1958, 52, 273.
225. WINDERLY C. — *Adv. Clin. Chem.*, 1961, 4, 208.
226. WOLFF H.P., TORBICA M., EISEMBURG J., EWE K., KNEDEL M., JAHRMARKER H., KODDING R. — *Klin. Wschr.*, 1962, 40, 400.

227. ZIMMER J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 250.
228. ZLOTNICK A., RODNAM G.P. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 742, 109.
-

IMPRIMERIE CLEDER

28, rue de la Pomme

T O U L O U S E
